



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

INDYRA ALENCAR DUARTE FIGUEIREDO

**Atividade espasmolítica não seletiva da
5,7-dimetoxiflavona isolada de *Zornia brasiliensis* Vogel
(Leguminosae) e seus possíveis mecanismos de ação em
aorta de rato**

João Pessoa – PB
2018

INDYRA ALENCAR DUARTE FIGUEIREDO

Atividade espasmolítica não seletiva da 5,7-dimetoxiflavona isolada de *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) e seus possíveis mecanismos de ação em aorta de rato

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do grau de **Bacharel em Farmácia**.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante

João Pessoa – PB
2018

F475a Figueiredo, Indyra Alencar Duarte.

Atividade espasmolítica não seletiva da 5,7-dimetoxiflavona isolada de *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) e seus possíveis mecanismos de ação em aorta de rato / Indyra Alencar Duarte Figueiredo. - - João Pessoa, 2018.

126p: il. -

Orientadora: Fabiana de Andrade Cavalcante.
Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. *Zornia brasiliensis*. 2. Flavonoide. 3. Vasorrelaxante. 4. Óxido nítrico.
5. Canais de cálcio. 6. Farmácia.

BS/CCS/UFPB

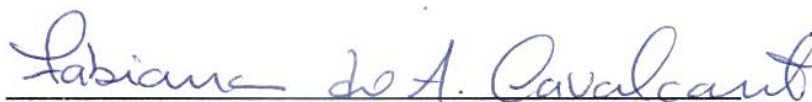
CDU: 582.755.5(043.2)

INDYRA ALENCAR DUARTE FIGUEIREDO

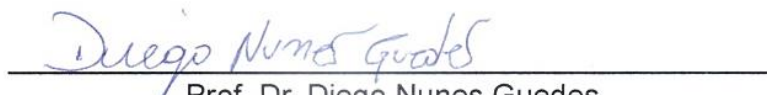
**Atividade espasmolítica não seletiva da 5,7-dimetoxiflavona isolada
de *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) e seus possíveis
mecanismos de ação em aorta de rato**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Coordenação do Curso de Graduação em
Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde,
da Universidade Federal da Paraíba, como
parte dos requisitos para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 16/03/2018



Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante
Orientadora - UFPB



Prof. Dr. Diego Nunes Guedes
Examinador - UFPB



Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras
Examinador - UFPB

João Pessoa – PB
2018

Dedicatórias

Aos meus pais, Franciland Duarte Figueiredo e Maria do Socorro Alencar da Silva Figueiredo, a quem devo minha vida e minha formação pessoal e profissional. Agradeço por sempre acreditarem em mim e não medirem esforços para me ver crescer. Por todas as abdições, incentivos, educação, amor e por apoiarem as minhas escolhas, eu vos dedico. Essa vitória também é de vocês.

Aos meus irmãos, Hugo Alencar Duarte Figueiredo e Hortência Alencar Duarte Figueiredo, pela cumplicidade, apoio e torcida de sempre. Vocês são os melhores que eu poderia ter.

Aos meus avós, Francisco Fernandes Figueiredo, Maria do Socorro Duarte Figueiredo, Antônio Nino da Silva e Maria Alencar da Silva, por cuidarem de mim e sempre ficarem felizes com minhas conquistas.

Ao meu tio, Antônio Nino da Silva Filho, que sempre ensinou aos seus sobrinhos a importância de se dedicar aos estudos, que nunca hesitou em ajudar e por sempre querer o melhor para nós.

Aos meus demais tios e tias, em especial, Bernadete Alencar da Silva e Eva Cristina Alencar da Silva, por todo o cuidado e zelo.

Aos meus primos, em especial, Olívia Alencar Ferreira, Maria Isabel Alencar Ferreira e Ludmilla Alencar Fortunato, por serem amigas e sempre vibrarem comigo a cada vitória.

Agradecimentos

Ao meu bom Deus, pela dádiva da vida, pela infinita paixão e misericórdia, por nunca me desamparar, por me proteger, por ser um refúgio diante de todas as dificuldades e por guiar meus caminhos e escolhas. Agradeço-te Senhor, por tudo que alcancei em minha vida e por todas as bênçãos que ainda irei receber, pois sei que o Senhor nunca irá me abandonar.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, por toda dedicação, confiança, apoio, cuidado, conselhos e ensinamentos que irão ficar gravados. Grata a Deus por me permitir conhecer e ser orientada por uma profissional ética, comprometida e que trabalha com tanto amor, a qual se tornou uma grande referência para minha vida.

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, o qual tanto me orgulha. Agradeço por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, e por ser uma inspiração de dedicação e amor à profissão.

Aos Professores Dr. Josean Fachine Tavares, Dr. Marcelo Sobral da Silva e sua então orientanda Anne Deyse Soares da Silva pelo fornecimento do produto-teste que permitiu a realização deste trabalho.

Aos alunos de Iniciação Científica, Rayane Fernandes Pessoa, Rafael Lima Marinho Paiva e João Pedro Moura Lima, por me acompanharem nos experimentos e nunca medirem esforços para ajudar. Saibam que se torna fácil esquecer os problemas quando estamos juntos. Tornamo-nos irmãos científicos e tenho certeza que levarei vocês para sempre em meu coração.

À Sarah Rebeca Dantas Ferreira, minha companheira desde que cheguei ao laboratório, um ser humano cheio de luz, de amor e de boas energias. Obrigada pela amizade, por sempre me ouvir sem hesitar, por apoiar as minhas decisões e nunca julgar e por ser a melhor parceira de viagens. Se teus caminhos te levarem para outro lugar, saiba que sempre estarei por perto. Tenho orgulho de você e torço muito pelo seu sucesso.

À Giulyane Targino Aires Moreno, pelos primeiros ensinamentos dos protocolos experimentais desenvolvidos no laboratório enquanto alunas de Iniciação Científica, e por toda amizade construída nos anos que passamos juntas. Mesmo distante, tenho muito carinho por você e sou grata por tudo.

A toda a equipe que fez ou faz parte do Laboratório de Farmacologia Funcional, Alana Cristina Costa, Anderson Fillyp Avelino Diniz, Antônio Raphael

Cavalcanti, Bárbara Cavalcanti Barros, Elba dos Santos Ferreira, Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira, Francisco Fernandes Lacerda Júnior, Giuliana Amanda de Oliveira, Giulyane Targino Aires Moreno, Iana Vitória de Souza Oliveira, Iara Luna Leão de Souza, Italo Rossi Martins, João Pedro Moura, Joedna Cavalcante Pereira, José Lucas Ferreira Marques Galvão, Kimã Barbosa Meira, Laiz Aline Silva Brasileiro, Luiz Henrique César Vasconcelos, Maria da Conceição Correia Silva, Maria Thaynan de Lima Carvalho, Milena Medeiros, Paula Benvindo Ferreira, Rafael Lima Marinho Paiva, Rayane Fernandes Pessoa, Renata de Souza Sampaio, Sarah Rebeca Ferreira e Thiago Afonso Melo, pela boa convivência e por toda ajuda nos experimentos e nas correções dos trabalhos.

Aos meus amigos da graduação, Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti, Renato Henrique Martins Galdino, Matheus Marley Bezerra Pessoa, Anna Karolinne Balbino Alves da Silva, Monique Emanuela Frutuoso Xavier Barros e Ana Rita Rodrigues de Almeida Silva, pela amizade e companheirismo que me concederam. Obrigada por tornarem os momentos difíceis de aulas e provas mais leves e divertidos. Vocês serão excelentes profissionais e me orgulho muito de tê-los como amigos.

Aos demais amigos, Alana Costa, Luiz Henrique Agra, Giuliana Amanda de Oliveira, Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira e Bárbara Cavalcanti Barros (juntamente com seu bebê, nosso sobrinho Rafael Barros), por todo apoio, conselhos e pelos momentos hilários e discussões produtivas que tivemos. Vocês são grandes amigos e tenho um carinho imenso por cada um de vocês.

Aos amigos de infância, Lucas Medeiros, Tainah Gonçalves, Monalisa Bastos, Mayane Fernandes, Débora Galiza e Sárvia Fernandes, por mesmo distante torcerem por mim e pelos momentos divertidos que passamos quando nos reencontramos.

A Rodrigo Silva de Andrade, um presente que o curso de Farmácia me proporcionou. Obrigada por me conhecer e entender tão bem, por cuidar de mim, por me ouvir com paciência quando preciso desabafar, por me aconselhar, por me ajudar sem hesitar, por ser essa pessoa incrível e de um coração enorme. Sou grata a Deus por te ter em minha vida e por todos os momentos difíceis que você, com seu bom humor e jeito brincalhão, me fez melhorar e esquecer. Tenho muito orgulho do excelente profissional que és, e tenho certeza que terás muito sucesso na vida, porque és esforçado e merecedor. Conte comigo para o que der e vier.

A todos os professores que compõem o Curso de Graduação em Farmácia, em especial: Celidarque Diniz, Fábio Santos, Francisco Roberto, Pablo Queiroz, Islânia Albuquerque, Luciana Aranha, Walleri Reis e Robson Veras, que nesta reta final auxiliaram no meu processo de abreviamento do curso sem medir esforços, além de Adalberto Coelho, Bagnólia Araújo, Cláudio Júnior, Danielle Idalino, Fabiana Cavalcante, Isabelle Gomes, João Vianney, José Carlos Lacet e Zélia Braz por também serem exemplos de bons profissionais e engrandecerem o curso de Farmácia.

À Roberta Parentoni e José Crispim Duarte, pelo trabalho em conduzir o Biotério “Prof. Thomas George”, e por serem sempre solícitos para nos ajudar na disponibilização e cuidado com os animais.

Ao Sr. Luís C. Silva e a Adriano S. Cordeiro, pelo trabalho executado no Biotério.

À Mônica Rodrigues da Silva, um ser humano iluminado, que contagia a todos com sua alegria, sempre com palavras de carinho e prestando trabalhos essenciais ao laboratório.

Ao Professor João Samuel Meira, do Conselho Federal de Farmácia, pelo apoio financeiro concedido para participação do Curso de Inverno de Farmacologia na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro durante dois anos de Iniciação Científica.

À Universidade Federal da Paraíba, instituição que me formou como profissional de Farmácia, pelo apoio físico e institucional.

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a minha formação, e desenvolvimento deste Trabalho de Conclusão de Curso.

Índyra Alencar Duarte Figueiredo

Resumo

RESUMO

Zornia brasiliensis Vogel é conhecida popularmente como “urinária”, “urinana” ou “carrapicho” e o extrato etanólico bruto obtido de suas partes aéreas, solubilizado em Cremophor®, apresentou atividade espasmolítica em útero de rato, íleo e traqueia de cobaia, corpo cavernoso e aorta de rato. Entre os metabólitos secundários desta espécie, destacam-se os flavonoides que são relatados na literatura por apresentarem efeito sobre a musculatura lisa. Já foi relatado que o flavonoide 5,7-dimetoxiflavona (5,7-DMF), solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO), apresenta atividade vasorrelaxante em aorta de rato. Diante disso, o objetivo do trabalho foi investigar se o flavonoide 5,7-DMF isolado de *Z. brasiliensis* apresentaria efeito espasmolítico em outros modelos de músculo liso fásico e tônico, além de caracterizar o mecanismo de ação daquele que tivesse maior potência e/ou eficácia farmacológica, comparando com os já descritos para este flavonoide. As contrações isotônicas e isométricas foram avaliadas. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela CEUA/UFPB (certidão: 129/16). Em íleo de cobaia, o flavonoide antagonizou de forma mais potente as contrações fásicas induzidas por histamina ($CI_{50} = 9,9 \pm 1,4 \times 10^{-6}$ M) do que por carbachol ($CI_{50} = 3,2 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M). A 5,7-DMF também relaxou de maneira equipotente a traqueia de cobaia pré-contraída com carbachol tanto na presença ($CE_{50} = 2,4 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M) quanto na ausência ($CE_{50} = 2,6 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M) de epitélio funcional. Diferentemente, em aorta de rato a 5,7-DMF relaxou a aorta pré-contraída com fenilefrina com uma potência maior na presença ($CE_{50} = 4,5 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ M) do que na ausência ($CE_{50} = 1,7 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) de endotélio funcional, indicando uma participação dos fatores relaxantes derivados do endotélio na ação vasorrelaxante da 5,7-DMF. Por apresentar maior potência relaxante em aorta de rato dentre os órgãos testados, aliado ao fato do flavonoide ter sido mais potente quando era solubilizado em Cremophor® do que em DMSO, decidiu-se continuar o mecanismo de ação da 5,7-DMF em aorta de rato. Pode-se observar que na presença de atropina ($CE_{50} = 3,8 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ M), a curva controle de relaxamento da 5,7-DMF não foi deslocada, descartando a participação dos receptores muscarínicos endoteliais no seu efeito vasorrelaxante. Para confirmar a participação da via do óxido nítrico (NO), um dos principais fatores relaxantes derivados do endotélio, utilizou-se o L-NAME, um inibidor da sintase do NO (NOS), e a curva foi deslocada para direita na presença desse inibidor ($CE_{50} = 2,0 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) com redução da potência vasorrelaxante. Esse efeito inibitório do L-NAME foi revertido na presença de altas concentrações de L-arginina ($CE_{50} = 3,4 \pm 0,8 \times 10^{-6}$ M). Além disso, a curva de relaxamento da 5,7-DMF foi desviada para esquerda na presença apenas da L-arginina, com aumento da potência relaxante ($CE_{50} = 2,3 \pm 0,5 \times 10^{-6}$ M). Seguindo a via *downstream* do NO, pode-se observar que na presença do inibidor da PKG, o Rp-8-Br-PET-cGMPS, a curva controle de relaxamento da 5,7-DMF foi desviada para a direita, com diminuição da potência vasorrelaxante ($CE_{50} = 8,3 \pm 1,7 \times 10^{-6}$ M). Diante desses resultados comprova-se que a via NO/PKG está envolvida no efeito vasorrelaxante do flavonoide. Como alvos da PKG tem-se os canais de K^+ ou de Ca^{2+} , resolveu-se avaliar a participação destes no efeito vasorrelaxante de 5,7-DMF em situações de aumento moderado ou alto de K^+ e pode-se observar uma equipotência em a 5,7-DMF relaxar a aorta pré-contraída com 30 ($CE_{50} = 1,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) ou 80 mM de KCl ($CE_{50} = 2,2 \pm 0,2 \times 10^{-5}$ M), indicando uma possível participação dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_v). Esta hipótese foi confirmada pela observação do desvio das curvas controle cumulativas com $CaCl_2$ em meio despolarizante para a direita, de maneira não paralela e com redução do E_{max} . Além disso, a 5,7-DMF relaxou a aorta pré-contraída com S(-)-Bay K8644, um ativador de Ca_v1 ($CE_{50} = 3,5 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ M), sugerindo o bloqueio desses canais. Diante desses resultados, concluiu-se que a 5,7-DMF apresenta efeito espasmolítico não seletivo nos órgãos testados, e em aorta de rato seu efeito foi potencializado quando solubilizada em Cremophor®, e seu mecanismo de ação se dá por modulação positiva da via do NO/PKG e negativa dos Ca_v1 .

Palavras-chave: *Zornia brasiliensis*, flavonoide, vasorrelaxante, óxido nítrico, canais de cálcio.

Abstract

ABSTRACT

Zornia brasiliensis Vogel is popularly known as "urinaria", "urinana" or "carrapicho" and the crude ethanolic extract obtained from its aerial parts, solubilized in Cremophor[®], showed spasmolytic activity in ileum and trachea of guinea pig, rat uterus, cavernous body and aorta. Among other secondary metabolites, this species has flavonoids, which are reported in the literature because they have an effect on the smooth muscle. It has been reported that the 5,7-dimethoxyflavone (5,7-DMF) flavonoid, solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO), presents vasorelaxant activity in the rat aorta. The aim of this study was to investigate whether the flavonoid 5,7-DMF isolated from *Z. brasiliensis* would present a spasmolytic effect in other models of phasic and tonic smooth muscle, in addition to characterize the mechanism of action of the one that had greater pharmacological potency, compared to those already described for this flavonoid. Isotonic and isometric contractions were evaluated. All experimental protocols were approved by CEUA/UFPB (certificate: 129/16). In guinea pig ileum, flavonoid more potently antagonized the phasic contractions induced by histamine ($IC_{50} = 9.9 \pm 1.4 \times 10^{-6}$ M) than by carbachol (CCh) ($IC_{50} = 3.2 \pm 0.5 \times 10^{-5}$ M). 5,7-DMF also relaxed equipotently the guinea pig trachea pre-contracted with CCh both in the presence ($EC_{50} = 2.4 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ M) and in the absence ($EC_{50} = 2.6 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ M) of functional epithelium. Different, in isolated rat aorta, 5,7-DMF relaxed the pre-contracted aorta with phenylephrine with greater potency in the presence ($EC_{50} = 4.5 \pm 0.7 \times 10^{-6}$ M) than in absence ($EC_{50} = 1.7 \pm 0.3 \times 10^{-5}$ M) of functional endothelium, indicating the participation of the endothelium-derived relaxing factors in the 5,7-DMF vasorelaxant action. Because of the greater relaxing potency in the rat aorta between the organs tested, along with the fact that flavonoid was more effective and potent when it was solubilized in Cremophor[®] than in DMSO, we decided to investigate the mechanism of action of 5,7-DMF in rat aorta. It can be observed that in the presence of atropine ($EC_{50} = 3.8 \pm 0.7 \times 10^{-6}$ M), the relaxation control curve of 5,7-DMF was not displaced, discarding the participation of endothelial muscarinic receptors in its vasorelaxant effect. To confirm the participation of the nitric oxid (NO) pathway, one of the main endothelium-derived relaxing factors, L-NAME an NO synthase inhibitor (NOS), was used and the curve was shifted to right in the presence of this inhibitor ($EC_{50} = 2.0 \pm 0.3 \times 10^{-5}$ M) with reduction of the relaxing potency. This inhibitory effect of L-NAME was reversed in the presence of high concentrations of L-arginine ($EC_{50} = 3.4 \pm 0.8 \times 10^{-6}$ M). In addition, the relaxation curve of 5,7-DMF was shifted to the left in the presence of only L-arginine, with increasing relaxation potency ($EC_{50} = 2.3 \pm 0.5 \times 10^{-6}$ M). Following the downstream pathway of NO, it can be observed that in the presence of PKG inhibitor, Rp-8-Br-PET-cGMPS, the relaxation control curve of 5,7-DMF was shifted to right, with a decrease in vasorelaxant potency ($EC_{50} = 1.1 \pm 0.1 \times 10^{-5}$ M). In view of these results it is concluded that the NO/PKG pathway is involved in the vasorelaxant effect of flavonoid. As some of the targets of PKG are the K^{+} and Ca^{2+} channels, it was decided to evaluate their participation in the vasorelaxant effect of 5,7-DMF in moderate or high K^{+} increases and an equipotency can be observed in relaxing the aorta contracted with KCl 30 ($EC_{50} = 1.5 \pm 0.3 \times 10^{-5}$ M) or 80 mM ($EC_{50} = 2.2 \pm 0.2 \times 10^{-5}$ M), indicating a possible participation of the voltage-dependent Ca^{2+} channels (Ca_v). This hypothesis was confirmed by observation of a shift to the right of the cumulative control curves with $CaCl_2$ in depolarizing medium, in a non-parallel manner and with reduction in E_{max} . In addition, 5,7-DMF relaxed the pre-contracted aorta with S-(-)-Bay K8644, a Ca_v1 activator ($EC_{50} = 3.5 \pm 0.7 \times 10^{-6}$ M), suggesting blockage of these channels. In view of these results, it was concluded that 5,7-DMF presents a non-selective spasmolytic effect in the organs tested, and in the rat aorta its effect was potentiated when solubilized in Cremophor[®], and its mechanism of action is by positive modulation of the NO/PKG pathway and negative modulation of Ca_v1 .

Keywords: *Zornia brasiliensis*, flavonoid, vasorelaxant, nitric oxide, calcium channels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotos da espécie <i>Zornia brasiliensis</i>	30
Figura 2 – Estrutura básica de um flavonoide.....	31
Figura 3 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K^+	35
Figura 4 – Mecanismo farmacomecânico da contração muscular lisa pela ativação do sistema efetor $G_{q/11}$ - PLC β 1.....	37
Figura 5 – Mecanismo de manutenção da contração no músculo liso pela ativação da via $G_{12/13}$ -ROCK.....	39
Figura 6 – Mecanismo do relaxamento no músculo liso vascular induzido pelas vias efetoras do cAMP e cGMP.....	42
Figura 7 – Registros originais representativos do efeito relaxante da 5,7-DMF em traqueia isolada de cobaia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.	63
Figura 8 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta isolada de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.	66
Figura 9 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta isolada de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 10 μ M de atropina (B).	70
Figura 10 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta isolada de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 10^{-4} M de L-NAME (B) ou 10^{-4} M de L-NAME + 10^{-3} M de L-arginina (C) ou 10^{-3} M de L-arginina (D) em anéis de aorta isolados de rato com endotélio funcional.....	73
Figura 11 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta isolada de rato com endotélio funcional pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 3×10^{-5} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS (B).	78
Figura 12 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta isolada de rato com endotélio funcional pré-contraída com 30 mM (A) ou 80 mM de KCl (B).	81

Figura 13 – Registros originais representativos das curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 na presença da 5,7-DMF nas concentrações de 10^{-6} M (A), 3×10^{-6} M (B), 10^{-5} M (C), 3×10^{-5} M (D) e 10^{-4} M (E) em anéis de aorta isolados de rato com endotélio funcional.....	84
Figura 14 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta isolada de rato com endotélio funcional pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN (A) ou S-(-)-Bay K8644 (B).....	88
Figura 15 – Proposta de mecanismo de ação vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta isolada de rato	101

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito da 5,7-DMF frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de histamina (A) ou de CCh (B).....	61
Gráfico 2 – Efeito relaxante da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na presença (■) e na ausência (□) de epitélio funcional.....	64
Gráfico 3 – Efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na presença (●) e na ausência (○) de endotélio funcional.....	67
Gráfico 4 – Efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (●) e na presença de $10 \mu\text{M}$ de atropina (Δ) em anéis de aorta isolados de rato com endotélio funcional.....	71
Gráfico 5 – Efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (●) e na presença de 10^{-4} M de L-NAME (○) ou 10^{-4} M de L-NAME + 10^{-3} M de L-arginina (\diamond) ou 10^{-3} M de L-arginina (\blacklozenge) em anéis de aorta isolados de rato com endotélio funcional.....	75
Gráfico 6 – Efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (●) e na presença de 3×10^{-5} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS (*) em anéis de aorta isolados de rato com endotélio funcional.....	79
Gráfico 7 – Efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 30 mM (■) e 80 mM de KCl (□) em anéis de aorta isolados de rato com endotélio funcional	82
Gráfico 8 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (●) e na presença da 5,7-DMF nas concentrações 10^{-6} M (○), 3×10^{-6} M (▲) e 10^{-5} M (Δ), 3×10^{-5} M (\blacklozenge) e 10^{-4} (\diamond) M em anéis de aorta isolado de rato com endotélio funcional.....	86
Gráfico 9 – Efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 80 mM de KCl (□) ou S-(-)-Bay K8644 (∇) em anéis de aorta isolados de rato com endotélio funcional.....	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Flavonas isoladas de <i>Zornia brasiliensis</i> e suas atividades biológicas	33
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de E_{\max} e CE_{50} da 5,7-DMF em músculos lisos fásicos e tônicos.	68
Tabela 2 – Valores de E_{\max} e CE_{50} da 5,7-DMF em anéis de aorta isolados de rato pré-contraídos com FEN, na ausência e na presença dos inibidores.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_c	concentração citosólica de Ca ²⁺
[K⁺]_e	concentração extracelular de potássio
5,7-DMF	5,7-dimetoxiflavona
AC	ciclase de adenilil
ACh	acetilcolina
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
CAM	calmodulina
cAMP	monosfato cíclico de adenosina
Ca_v	canais de cálcio dependentes de voltagem
CE₅₀	concentração de uma droga que produz 50% de seu efeito máximo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cGMP	monofosfato cíclico de guanosina
CI₅₀	concentração de uma droga que inibe 50% do efeito máximo de um agonista
CPI-17	inibidor da fosfatase da miosina potencializado pela PKC
DAG	diacilglicerol
e.p.m.	erro padrão da média
EDHF	fator hiperpolarizante derivado do endotélio
E_{max}	efeito máximo
G_{12/13}	proteína G ₁₂ ou proteína G ₁₃
GC	guanilil ciclase
GDP	difosfato de guanosina
GPCR	receptor acoplado à proteína G

G_{q/11}	proteína G _q ou proteína G ₁₁
GTP	trifosfato de guanosina
HAS	hipertensão arterial sistêmica
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
MLCP	fosfatase da cadeia leve dosina
MYPT1	subunidade 1 condutora da fosfatase da miosina
NCX	trocador Na ²⁺ /Ca ²⁺
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	ácido fosfatídico
PC	fosfatidilcolina
PGD₂	prostaglandina D ₂
PGH₂	prostaglandina H ₂
PGI₂	prostaciclina
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	proteína cinase dependente de cAMP
PKG	proteína cinase dependente de cGMP
PLC	fosfolipase C
PLD	fosfolipase D
PMCA	cálcio ATPase da membrana plasmática
RhoA	pequena proteína G ligante de GTP
RhoGEF	fator trocador de nucleotídeo de guanina da RhoA
ROK	cinase da RhoA

RS	retículo sarcoplasmático
RyR	receptor de rianodina
SERCA	cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático
ZIPK	proteína cinase de interação zíper

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Produtos naturais e plantas medicinais	26
1.2 Família Leguminosae	27
1.3 Gênero <i>Zornia</i>	29
1.4 <i>Zornia brasiliensis</i>	30
1.5 Flavonoides de <i>Zornia brasiliensis</i>	31
1.6 Contração e relaxamento do músculo liso.....	34
1.7 Hipertensão	43
2 OBJETIVOS.....	46
2.1 Gerais	47
2.2 Específicos	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 Material.....	49
3.1.1 Material botânico	49
3.1.2 Drogas-teste.....	49
3.1.3 Animais.....	49
3.1.4 Substâncias e reagentes	50
3.1.5 Soluções nutritivas	51
3.1.6 Preparação das soluções-mãe dos flavonoides para os ensaios farmacológicos	51
3.1.7 Aparelhos	52
3.2 Métodos.....	52
3.2.1 Triagem farmacológica preliminar	52
3.2.1.2 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona frente às contrações fásicas induzidas por histamina ou por CCh em íleo isolado de cobaia	52
3.2.1.3 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre às contrações tônicas induzidas por CCh em traqueia isolada de cobaia	53
3.2.1.4 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre às contrações tônicas induzidas por FEN em aorta isolada de rato.....	53
3.2.2 Investigação do mecanismo de ação da 5,7-dimetoxiflavona em aorta isolada de rato.....	55

3.2.2.1 Avaliação do envolvimento do receptor muscarínico no efeito vasorrelaxante produzido pela 5,7-dimetoxiflavona	55
3.2.2.1.1 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na presença e na ausência de atropina	55
3.2.2.2 Confirmação do envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito vasorrelaxante produzido pela 5,7-dimetoxiflavona	56
3.2.2.2.1 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na ausência e na presença de L-NAME e L-arginina	56
3.2.2.3 Avaliação da participação da proteína cinase dependente de cGMP (PKG) na ação relaxante da 5,7-DMF	56
3.2.2.3.1 Efeito da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS	56
3.2.2.4 Avaliação da participação dos canais de potássio ou de cálcio dependente de voltagem no efeito relaxante produzido pela 5,7-DMF	57
3.2.2.4.1 Efeito da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou 80 mM de KCl	57
3.2.2.4.2 Efeito da 5,7-DMF frente às contrações cumulativas induzidas por CaCl ₂ em meio despolarizante nominalmente sem Ca ²⁺	57
3.2.2.4.3 Efeito da 5,7-DMF sobre as contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644	58
3.3 Análise estatística	58
4 RESULTADOS.....	59
4.1.1 Triagem farmacológica preliminar	60
4.1.1 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona frente às contrações fásicas induzidas por histamina ou por CCh em íleo isolado de cobaia	60
4.1.2 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre às contrações tônicas induzidas por CCh em traqueia isolada de cobaia	62
4.1.3 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre às contrações tônicas induzidas por FEN em aorta isolada de rato.....	65
4.2 Investigação do mecanismo de ação vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta isolada de rato.....	69
4.2.1 Avaliação do envolvimento do receptor muscarínico no efeito vasorrelaxante produzido pela 5,7-DMF	69
4.2.1.1 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na ausência e na presença de atropina	69

4.2.2 Confirmação do envolvimento do NO no efeito vasorrelaxante produzido pela 5,7-dimetoxiflavona em aorta isolada de rato	72
4.2.2.1 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na ausência e na presença de L-NAME e L-arginina	72
4.2.3 Avaliação da participação da proteína cinase dependente de cGMP (PKG) na ação relaxante da 5,7-DMF	77
4.2.3.1 Efeito da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na presença e na ausência de Rp-8-Br-PET-cGMPS	77
4.2.4 Avaliação da participação dos canais de potássio ou de cálcio dependente de voltagem no efeito vasorrelaxante produzido pela 5,7-DMF	80
4.2.4.1 Efeito da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou 80 mM de KCl.....	80
4.2.4.2 Efeito da 5,7-DMF frente às contrações cumulativas induzidas por CaCl ₂ em meio despolarizante nominalmente sem Ca ²⁺	83
4.2.4.3 Efeito da 5,7-DMF sobre as contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644	87
5 DISCUSSÃO	90
6 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS.....	104
ANEXO.....	125
Anexo 1 – Certidão de aprovação do projeto junto à da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	126

1 Introdução

1.1 Produtos naturais e plantas medicinais

Ao longo da história, a natureza tem desempenhado um papel importante na geração de novos fármacos, seja pelo fornecimento de substâncias bioativas ou de protótipos moleculares para o desenvolvimento de derivados sintéticos, seja inspirando a síntese de novas moléculas relacionadas estruturalmente com o produto natural original. Em decorrência disto, produtos naturais ou derivados destes representaram cerca de 50% do total de fármacos disponibilizados para uso terapêutico entre os anos de 1981 e 2014 (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016).

A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. O profundo conhecimento do arsenal químico da natureza pelos povos primitivos e pelos indígenas pode ser considerado um fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo (VIEGAS-JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Dessa forma, os produtos naturais são reconhecidamente uma das fontes mais ricas da atual diversidade química, além de formar a base dos sistemas da medicina popular em diversas partes do mundo ao longo de milhares de anos e representarem uma fonte importante para a descoberta de medicamentos (CRAGG; NEWMAN, 2013).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que entre 65-80% da população dos países em desenvolvimento faz uso de plantas para o alívio de várias doenças (CALIXTO, 2005; MARTINS et al., 2015). As plantas consideradas medicinais são utilizadas desde a antiguidade pelas populações de todo o mundo no tratamento e cura de enfermidades. Esta prática tem ressurgido com maior força através da fitoterapia que proporciona outra opção medicamentosa atualmente aceita e bastante acessível em vários países (VERRI; MOURA; DE MOURA, 2018).

Com o objetivo de promover o desenvolvimento socioeconômico e sustentável da biodiversidade na área de plantas medicinais e fitoterápicos, e proporcionar melhorias na qualidade de vida da população brasileira, a partir de 2006, foi instituída pelo Ministério da Saúde a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, por meio do decreto de nº 5.813 (BRASIL, 2006). No Brasil, as diretrizes do Ministério da Saúde determinaram prioridades na investigação das

plantas medicinais, implantando a fitoterapia como prática oficial da medicina, orientando sua inclusão no Sistema Único de Saúde (VEIGA-JUNIOR, 2008).

Esta prática tem sido empregada principalmente para o cuidado das necessidades primárias de assistência à saúde, devido à falta de recursos financeiros para a compra de fármacos industrializados, além da tendência da utilização de produtos naturais por muitas comunidades. Dessa forma, a ampla aceitação a estes recursos está relacionada ao contexto sociocultural do nosso país, ao fácil acesso da população e ao potencial farmacológico das plantas medicinais e riqueza de seus constituintes ativos (WENDEL et al., 2008).

Na década de 90, a indústria farmacêutica aumentou seu interesse na descoberta de fármacos derivados de plantas, apesar dos vários obstáculos presentes no desenvolvimento destes (WALSH; FISCHBACH, 2010). Ainda assim, há uma grande complexidade e diversidade molecular de produtos naturais que ainda não foi totalmente explorada. Apesar das intensas investigações e pesquisas da flora terrestre, estima-se que apenas 15% das aproximadamente 300 mil espécies de plantas no mundo foram farmacologicamente estudadas para avaliar suas potencialidades na preparação de novos produtos farmacêuticos (BRANDÃO et al., 2010).

1.2 Família Leguminosae

Também conhecida como Fabaceae (IAPT, 2012), a família Leguminosae é considerada a terceira maior família de plantas (LEWIS et al., 2005), e a com maior em número de espécies na flora brasileira dentre as angiospermas (FORZZA et al., 2010). Esta família foi dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (também conhecida por Faboideae) (LEWIS et al., 2005). Entretanto, recentemente, uma nova classificação foi proposta pelo Legume Phylogeny Working Group (LPWG), havendo agora a divisão em seis subfamílias: Duparquetioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae e reconhecendo Mimosoideae como uma linhagem distinta, incluída na subfamília Caesalpinioideae (LPWG, 2017).

O sucesso desta família está associado à estratégia de fixação biológica de nitrogênio, realizada nos nódulos presentes nas raízes. Isso permitiu que o grupo

ocupasse e se diversificasse na região tropical, em especial nas áreas com solos pobres e lixiviados (SIMÕES et al., 2016).

Mundialmente, já foram identificados 751 gêneros e 19.500 espécies (LPWG 2013). Destas, 221 gêneros e 2.809 espécies ocorrem no Brasil (RANDO, 2016), dos quais 168 gêneros e 1.083 espécies se encontram na região Nordeste. Esta família é bem representada em praticamente todas as formações vegetais, mas, sobretudo na Amazônia e na Caatinga. Nesta última, já foram registrados 127 gêneros e 593 espécies, das quais 149 são endêmicas (LIMA et al., 2015; SIMÕES et al., 2016), e de acordo com Barbosa et al. (2007), na microrregião do cariri paraibano estão documentadas 71 espécies pertencentes a 34 gêneros.

O potencial econômico desta família é muito importante devido aos múltiplos usos, dentre os quais se destaca o da alimentação humana (DOYLE; LUCKOW, 2003; WOJCIECHOWSKI, 2003), já que estas mostram ser uma rica fonte de proteínas bem como de conteúdo mineral. Exemplos de alguns gêneros utilizados na alimentação são *Cicer* (“grão-de-bico”), *Phaseolus* (“feijão”), *Vicia* (“fava”), *Pisum* (“ervilha”), *Lens* (“lentilha”), *Arachis* (“amendoim”) e *Glycine* (“soja”), sendo, portanto, de alto valor em áreas deficientes de tais constituintes (JOLY, 2002).

Várias espécies já exibiram atividades medicinais, em especial as que são utilizadas para desordens no músculo liso, a citar: *Melanoxylon brauna* Schott (“braúna”) como antidiarreica, a *Senna alexandrina* Mill. (“sene”) e *Caesalpinia ferrea* Mart. Ex. Tul (“jucá”) como laxante, *Copaifera langsdorfii* Desf. (“copaíba”) e *Amburana cearenses* (Fr. All.) A. Smith (“cumarú”) como antiasmática, além de *Cajanus cajan* (L.) Millsp (“feijão-andu”) e *Bauhinia forficata* Link (“pata-de-vaca”) como hipotensora (TESKE; TRENTINI, 1995; DINIZ et al., 1998; SOUZA, 2013; LÓPEZ; SANTOS, 2015; MESSIAS et al., 2015).

Tratando-se de uma família com uma quantidade tão vasta de espécies é comum a produção de metabólitos secundários tão diversos. As espécies desta família acumulam substâncias com grande diversidade estrutural, tais como alcaloides, aminoácidos não proteicos, amins, fenilpropanoides, antraquinonas, terpenoides e flavonoides (WINK; MOHAMED, 2003). A taxonomia da família Leguminosae tem evoluído principalmente devido ao estudo da classe dos flavonoides, visto a importância destes metabólitos secundários e de sua diversidade metabólica nessa família (HEGNAUER; GRAYER-BARKMEIJER, 1993).

1.3 Gênero *Zornia*

Pertencente à família Leguminosae, o gênero *Zornia* possui cerca de 80 espécies, com uma distribuição pantropical (FORTUNA-PEREZ et al., 2013). O Brasil é um dos principais centros de diversidade deste gênero, que ocorre principalmente nos biomas da Caatinga e Cerrado, possuindo em torno de 36 espécies, sendo 15 endêmicas (PEREZ, 2009; FORTUNA-PEREZ et al., 2015).

O gênero contém espécies herbáceas e arbóreas, com flores dispostas em inflorescências espiciformes e seu fruto é lomentáceo (FORTUNA-PEREZ et al., 2013). A maioria das espécies de *Zornia* pode ser identificada pela comparação das características macro e micro-morfológicas do fruto (FORTUNA-PEREZ et al., 2015).

Algumas atividades farmacológicas já foram descritas para diversas espécies deste gênero, a citar: *Zornia gibbosa* Span. que apresentou atividade antioxidante e anti-inflamatória (LAXANE; SWARNKAR; SETTY, 2008; LAXANE et al., 2011); *Zornia tenuifolia* Moric. e *Zornia milneana* Mohlenbr. com atividade antibacteriana (DO NASCIMENTO; DE MELLO; CHIAPPETA, 1985; OBI et al., 2007); *Zornia setosa* Baker com efeito moluscicida (KLOOS et al., 1987); *Zornia elegans* (L) Perls com atividade antibacteriana (CHIAPPETA; DE MELLO, 1984); *Zornia diphylla* (L) Perls que exibiu um potencial antioxidante (BRAHMACHARI et al., 2009), antitumoral (ARUNKUMAR; NAIR; SUBRAMONIAM, 2012), citotóxico (BELCAVELLO et al., 2012), anticonvulsivante (GREETHA; SHILPA; MURUGAN, 2012), anti-inflamatório e antibacteriano (ARUNKUMAR et al., 2014). Além disso, *Z. diphylla* (L) Perls., ainda apresentou atividade espasmolítica em íleo de rato (ROJAS et al., 1999), sendo esta evidenciada também para a espécie *Z. venous* Mohlenbr (ROJAS et al., 1995), além de efeito hipotensor e bradicárdico em ratos espontaneamente hipertensos (SOARES et al., 2007).

Diversos flavonoides já foram isolados de algumas espécies deste gênero, onde foram identificados a 7,4'-diidroxiiisoflavona, a 5,7,3'-triidroxiiisoflavona, a 7-hidroxi-4'-metoxiiisoflavona, a 5,7-diidroxiiisoflavona, a 7,4'-dimetoxiiisoflavona, a 7-hidroxi-4'-metoxiflavona, a 7-3'-diidroxiiisoflavona, a 7,8-dihidroxi-4'-metoxiiisoflavona e a 7,4'-diidroxiiisoflavona (LEUNER et al., 2012; REN et al., 2012).

1.4 *Zornia brasiliensis*

Popularmente conhecida como “urinária”, “urinana” ou “carrapicho”, esta espécie está distribuída em diversos estados do Brasil, principalmente Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba, além de atingir também a Venezuela (MOHLENBROCK, 1961; AYMARD, 1999; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

Z. brasiliensis apresenta-se como um subarbusto com cerca 60 cm (Figura 1), com ramos decumbentes, folhas folioladas e inflorescência espiciforme. Geralmente floresce e frutifica de janeiro a agosto (PEREZ, 2009).

Figura 1 – Fotos da espécie *Zornia brasiliensis*.



A) Flores; **B)** Detalhe das folhas.

Fonte: <http://rubensplantasdobrasil.blogspot.com.br/2014/04/fabaceaezorniabrasiliensis-vogel.html>. Acesso em 11 de fevereiro de 2018.

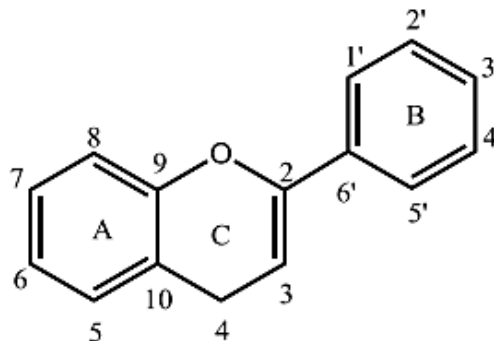
O uso popular desta espécie é relatado como diurética, para o tratamento de doenças venéreas e para o alívio de distúrbios gastrointestinais (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; DINIZ et al., 2002). Algumas atividades biológicas já foram descritas para esta espécie, como atividade moluscicida contra a espécie *Biomphalaria glabrata* (DAVID et al., 2007), tripanossomicida (AMBROZIN et al., 2008), atividade antitumoral (TA; WALLE, 2007; COSTA et al., 2015), fotoprotetora e antioxidante (GOMES, 2016). O extrato metanólico obtido de suas partes aéreas (ZB-EtOH_{PA}) apresentaram atividade tóxica frente à *Artemia salina* (ROUQUAYROL et al., 1980; DAVID et al., 2007). Já o extrato etanólico obtido das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* (ZB-EtOH_{PA}) apresentou baixa toxicidade por via oral (BATISTA,

2013), atividade antidiarreica em camundongos (OLIVEIRA, 2013), atividade espasmolítica em diversos músculos lisos, entre eles, traqueia e íleo isolados de cobaia, útero isolado de rata, corpo cavernoso e aorta isolados de rato (OLIVEIRA et al., 2014, 2016a,b; FERREIRA, 2018).

1.5 Flavonoides de *Zornia brasiliensis*

Considerados a maior classe de compostos fenólicos encontrados em vegetais como metabólitos secundários (AGATI et al., 2012), os flavonoides são compostos aromáticos de baixo peso molecular, caracterizados por um núcleo flavânico e um esqueleto carbonado com configuração $C_6-C_3-C_6$. A estrutura básica dos flavonoides (Figura 2) consiste em dois anéis de benzeno (anel A e B) ligados por um anel pirano (anel C) que contém oxigênio. Adicionalmente, os grupos de flavonoides se subdividem em classes, diferenciadas de acordo com sua estrutura química, sendo os flavonois, as flavanonas e as flavonas os mais comuns (PINHEIRO; JUSTINO, 2012).

Figura 2 – Estrutura básica de um flavonoide.



Fonte: PINHEIRO; JUSTINO, 2012.

Estes metabólitos secundários, os quais compreendem mais de 10.000 estruturas (POLLASTRI; TATTINI, 2011), são pigmentos naturais de plantas encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás, café e vinhos (TAHARA, 2007).

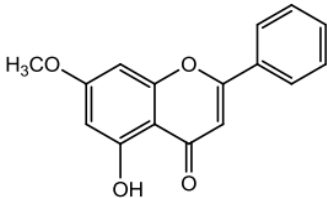
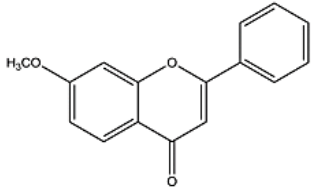
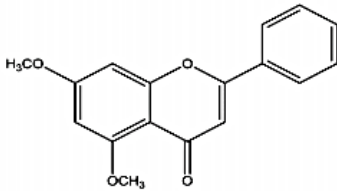
Diversas atividades farmacológicas já foram relatadas para esta classe de compostos fenólicos, incluindo antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória,

antidiabética, antitumoral, antioxidante e de proteção cardiovascular (KRYCH; GEBICKA, 2013; RAGAB et al., 2014; TIAN et al., 2014; ZHANG et al., 2015).

Os flavonoides são substâncias importantes devido às suas diversas atividades sobre os vários sistemas biológicos, em especial, sobre o sistema cardiovascular. Dessa forma, o consumo de alimentos ricos nestes compostos está associado com a redução do risco de várias doenças crônicas (IVEY et al., 2015), como as cardiovasculares, sendo que o efeito protetor desses alimentos é devido, em parte, às suas propriedades antioxidantes (CONCEIÇÃO et al., 2017). Além de apresentarem atividades sobre o músculo liso vascular, também há relatos de flavonoides apresentando atividades sobre outros músculos lisos como útero de rata (LIMA, 2004; MACÊDO et al., 2011; LIU et al., 2018; FERREIRA, 2018), corpo cavernoso (HNATYSZYN et al., 2004), íleo (SANTOS, 2007; LIMA, 2008; MACÊDO et al., 2011) e traqueia de cobaia (MACÊDO et al., 2011; YANG et al., 2013), e aorta de rato (SILVA, 2005; MACÊDO et al., 2011; CHEN; KO, 2017).

Estudos fitoquímicos recentes com *Zornia brasiliensis* levaram ao isolamento substâncias, sendo todas relatadas pela primeira vez neste gênero. A espécie apresentou em sua constituição química: chalconas, a 2',4'-dihidroxichalcona e a zornioside, um pterocarpano, o 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano e uma saponina, a sayasaponina IV. Além disso, três flavonas, descritas no quadro abaixo, também foram isoladas (SILVA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2018).

Quadro 1 – Flavonas isoladas de *Zornia brasiliensis* e suas atividades biológicas.

Flavonas isoladas	Atividades biológicas
 <p>(5-hidroxi-7-metoxiflavona)</p>	<p>—</p>
 <p>(7-metoxiflavona)</p>	<p>Quimioprotetora (TA; WALLE, 2007) Tripanossomicida (AMBROZIN et al., 2008) Antinociceptiva (SILVA et al., 2013)</p>
 <p>(5,7-dimetoxiflavona)</p>	<p>Antitumoral (WEN; WALLE; WALLE, 2005; WEN; WALLE, 2005; TSUJI; WALLE, 2006; WEN; WALLE, 2007; LI; ZHANG; WANG, 2017; BAE et al., 2018) Anti-inflamatória (SAE-WONG et al., 2011) Antipirética (PANTHONG et al., 1989) Antioxidante (KANG et al., 2011; KIM et al., 2012) Combate a osteoartrite (KOBAYASHI et al., 2018) Antiobesidade (SONG et al., 2016) Antimutagênica (AZUMA et al., 2011) Anticolinesterásica (SONGNGAM et al., 2014) Tocolítica em ratas (FERREIRA, 2018) Vasorrelaxante em aorta de rato (TEP-AREENAN; SAWASDEE; RANDALL, 2010).</p>

Fonte: Autor, 2018.

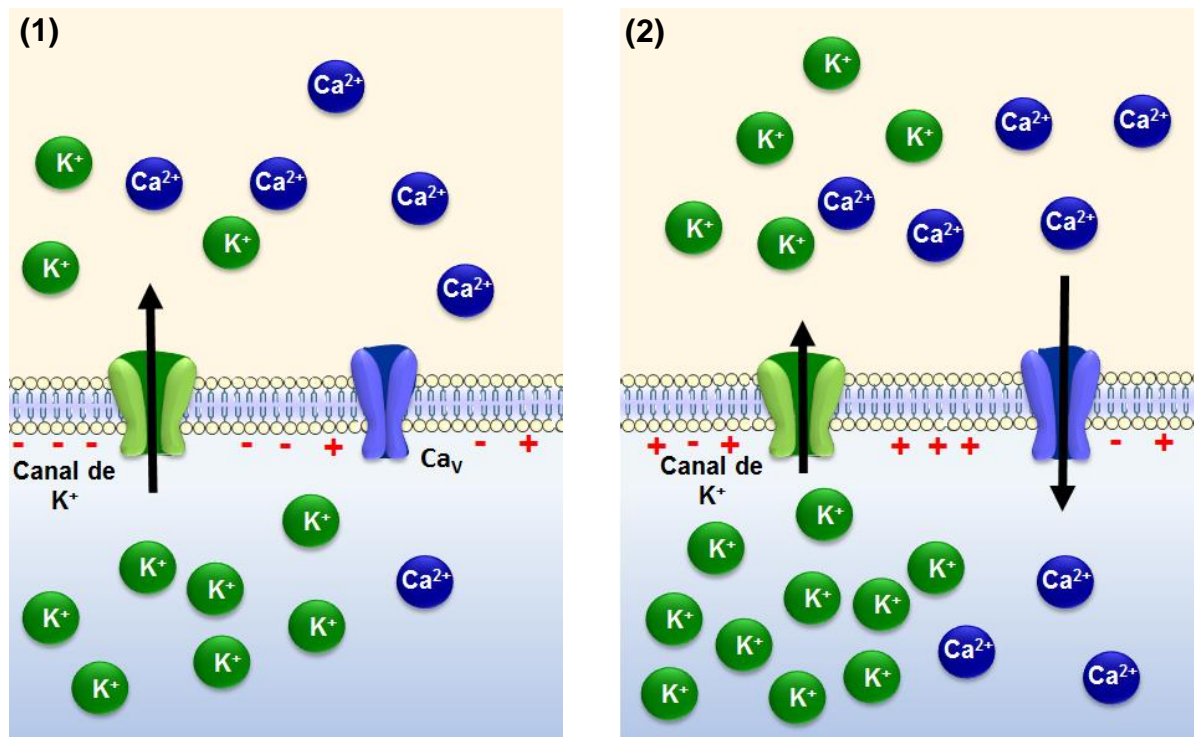
1.6 Contração e relaxamento do músculo liso

O músculo liso é o principal tipo de músculo que controla a maioria dos sistemas de órgãos ocos do corpo (WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005), como trato gastrointestinal, vias respiratórias e vasos sanguíneos, tornando-o, assim, um tecido fundamental para homeostasia do organismo (WEBB, 2003). Dessa forma, anormalidades no processo de contratilidade do músculo liso determinam várias desordens e doenças como diarreia e cólicas intestinais (KIM et al., 2008), asma brônquica (WEBB, 2003) e hipertensão (UEHATA et al., 1997).

Na musculatura lisa, um aumento na concentração de cálcio citosólico ($[Ca^{2+}_c]$) é a causa primária para o início da contração (HILL-EUBANKS et al., 2011), e esta, em resposta a vários agentes, é frequentemente composta por duas fases: um componente fásico e rápido, seguido por um lento e sustentado, o componente tônico (BOLTON, 1979). Esta resposta bifásica é devido à fonte dual de Ca^{2+} no músculo liso, sendo uma extracelular, que permite o influxo de Ca^{2+} para o citoplasma através dos canais na membrana plasmática, e outra intracelular, que representa os estoques internos, em especial o retículo sarcoplasmático (RS), que libera Ca^{2+} para o citosol (MA; PAN, 2003).

Duas vias clássicas aumentam o influxo de Ca^{2+} para a contração do músculo liso, são os mecanismos de acoplamento eletromecânico (Figura 3) e farmacomecânico (Figura 4). Os mecanismos que levam a uma resposta contrátil através do acoplamento eletromecânico são devido a uma despolarização de membrana diretamente pelo aumento da concentração extracelular de potássio ou indiretamente pela ligação dos agonistas aos seus receptores levando à abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), causando aumento da ($[Ca^{2+}]_c$) e, conseqüentemente, a contração (REMBOLD, 1996).

Figura 3 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K^+ .



(1) Durante o repouso, o gradiente químico favorece o efluxo de íons K^+ através de seus canais de vazamento, deixando a região perimembranar interna das células musculares lisas polarizadas negativamente; (2) um aumento na $[K^+]_e$ diminui o efluxo desses íons, havendo acúmulo de cargas positivas na região perimembranar interna; a célula despolariza, ocasionando a ativação dos Ca_v que leva ao influxo de Ca^{2+} com consequente contração.

Fonte: FERREIRA, 2018.

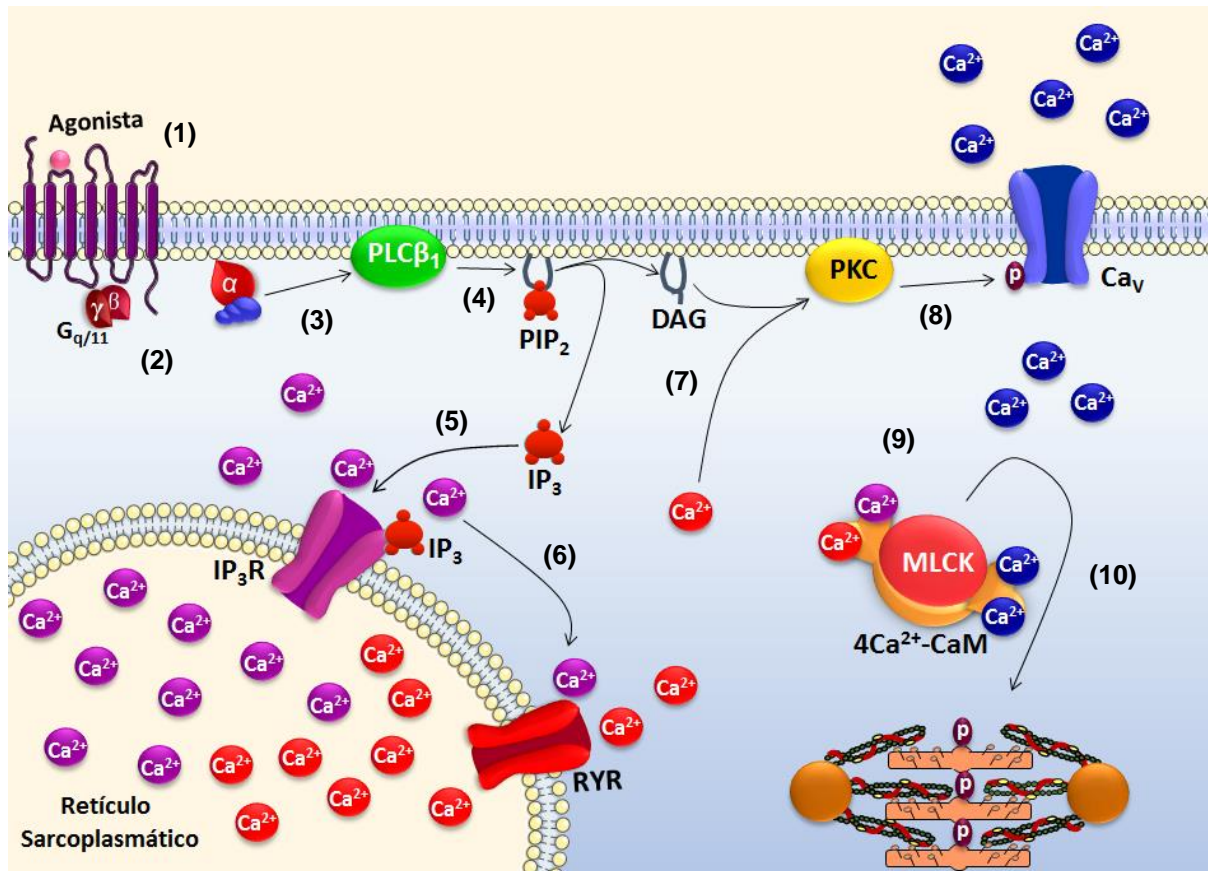
Já os mecanismos farmacomecânicos de contração, ocorrem quando um agonista como a histamina, acetilcolina, fenilefrina, entre outros, se liga a seus receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata do inositol, através das proteínas G_q ou G_{11} , cujas subunidades α ativam a fosfolipase C $\beta 1$ (PLC $\beta 1$) e,consequentemente, promovem hidrólise de fosfolipídios presentes na membrana do tipo 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP $_2$), produzindo o 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP $_3$) e diacilglicerol (DAG) (BILLINGTON; PENN, 2003; BERRIDGE, 2009).

O IP $_3$ ativa receptores sensíveis ao IP $_3$ (IP $_3$ R) presentes no retículo sarcoplasmático permitindo a liberação Ca^{2+} , que por sua vez ativa os receptores de rianodina, processo este denominado de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (ORALLO, 1996). Esse aumento na $[Ca^{2+}]_c$ resulta na translocação da proteína cinase C ou proteína cinase dependente de Ca^{2+} (PKC) para a membrana

plasmática, onde é ativada quando entra em contato com o DAG. A PKC fosforila proteínas alvo específicas, como os Ca_v presentes na membrana plasmática, ativando-os, promovendo o influxo de Ca^{2+} (BERRIDGE, 2009).

A contração das células musculares lisas ocorre por meio da interação dos filamentos grossos de miosina com os filamentos finos de actina. Para que isso ocorra, deve haver inicialmente a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) (SOMLYO; SOMLYO, 2003). O aumento da $[Ca^{2+}]_c$, levando à formação do complexo cálcio-calmodulina (Ca^{2+} -CaM), ativa a proteína cinase da cadeia leve de miosina (MLCK) (ECKERT et al., 2000) que irá fosforilar a MLC tornando-a passível de interação com a actina. Quando ocorre redução dos níveis de $[Ca^{2+}]_c$, uma segunda enzima é ativada, a fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), que irá desfosforilar a MLC promovendo relaxamento. Dessa forma, o balanço entre a atividade da MLCK e da MLCP controla o estado de tensão muscular (HIRANO et al., 2003; IHARA; MACDONALD, 2007; MURTADA; HOLZAPFEL, 2014).

Figura 4 – Mecanismo farmacomecânico da contração muscular lisa pela ativação do sistema efetor $G_{q/11}$ - $PLC\beta_1$.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) As proteínas $G_{q/11}$ trocam GDP por GTP na sua subunidade α (não mostrado na figura), tornando-se ativa; (3) A subunidade $\alpha_{q/11}$ -GTP ativa a enzima $PLC\beta_1$; (4) A $PLC\beta_1$ cliva o lipídio de membrana PIP_2 em IP_3 e DAG; (5) O IP_3 migra pelo citoplasma e ativa o IP_3R presente na membrana do RS, liberando o Ca^{2+} dos estoques; (6) O Ca^{2+} liberado ativa o RyR , fazendo com que mais Ca^{2+} seja liberado para o citoplasma; (7) O Ca^{2+} que foi liberado, juntamente com o DAG ativam a PKC; (8) A PKC ativada fosforila os Ca_v1 promovendo o influxo de Ca^{2+} através dos mesmos; (9) O aumento da $[Ca^{2+}]_c$ aumenta a afinidade pela CaM formando o complexo $4Ca^{2+}$ - CaM e ativando a MLCK; (10) A MLCK ativada fosforila a MLC e esta se torna ativa e interage com os filamentos de actina, desencadeando a contração do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

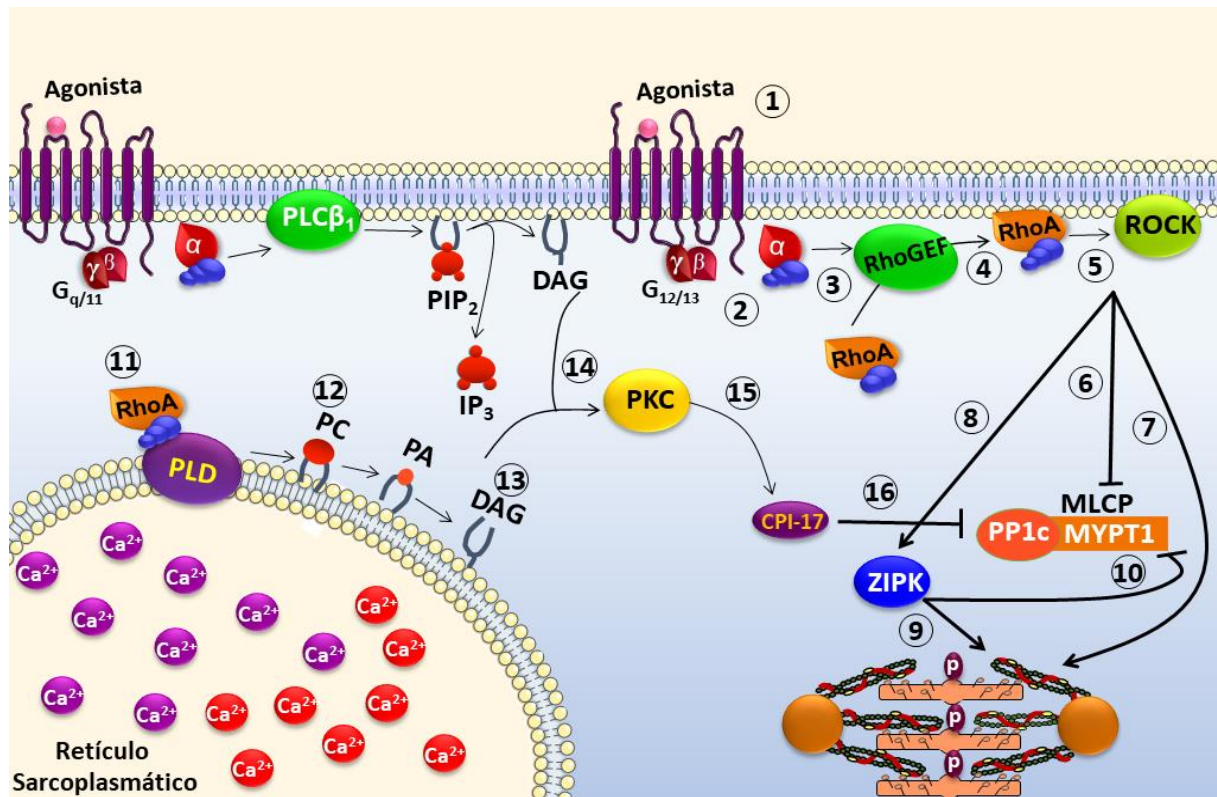
Fonte: FERREIRA, 2018.

Uma via alternativa que contribui para a contração no músculo liso (Figura 5) é através da modulação da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), principalmente pela pequena proteína ligante de trifosfato de guanosina (RhoA-GTP) e a sua cinase associada (ROK), uma proteína cinase serina/treonina (KARAKI et al., 1997; HORI; KARAKI, 1998). Vários agonistas contráteis que aumentam a $[Ca^{2+}]_i$ via GPCRs, acoplados principalmente, às proteínas $G_{12/13}$ ou $G_{q/11}$, levam a ativação direta ou indireta do fator trocador de nucleotídeo de guanina da RhoA (RhoGEF), que ativa a RhoA, por trocar difosfato de guanosina (GDP) por GTP nessa proteína (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A RhoA-GTP ativa sua cinase associada, a ROK, essa, por sua vez, fosforila a MLCP, tornando-a inativa (KIMURA et al., 1996).

Embora a ROCK fosforile diretamente a MLC (TOTSUKAWA et al., 2000), sua ação principal na sensibilização ao cálcio parece ser a inibição da MLCP, esta ação se dá pela fosforilação direta da MYPT1, causando a sua dissociação e inibição da PP1c da MLCP (SOMLYO; SOMLYO, 2003; MURTHY, 2006). A ROCK também pode ativar uma proteína cinase independente de Ca^{2+} , mais conhecida como proteína cinase de interação zíper (ZIPK). A ZIPK pode fosforilar diretamente a MLC, no entanto seu alvo principal é a MYPT1, a qual é fosforilada inibindo a ação da MLCP (MURTHY, 2006).

A RhoA-GTP também estimula a fosfolipase D (PLD), essa enzima está principalmente associada a membranas intracelulares, mas também é encontrada na membrana plasmática e é específica para fosfatidilcolina (PC), liberando ácido fosfatídico (PA) que através da ação da enzima fosfo-hidrolase é desfosforilado a DAG levando a ativação sustentada da PKC (BERRIDGE, 2009). A ativação da PKC também pode ser dependente de $G_{q/11}$, da PLC que forma DAG a partir da hidrólise do PIP_2 . A PKC pode fosforilar a proteína inibitória endógena da MLCP (CPI-17), aumentando assim sua potência inibitória sobre a PP1c por mais de 1000 vezes, inibindo assim a ação da MLCP, auxiliando na contração do músculo liso (SOMLYO; SOMLYO, 2003; MURTHY, 2006; FEHER, 2012).

Figura 5 – Mecanismo de manutenção da contração no músculo liso pela ativação da via $G_{12/13}$ -ROCK.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) As proteínas $G_{12/13}$ troca GDP por GTP na sua subunidade α (não mostrado da figura), tornando-se ativa; (3) A subunidade $\alpha_{12/13}$ -GTP ativa o RhoGEF; (4) O RhoGEF faz com que a RhoA troque GDP por GTP, sendo translocada para a membrana; (5) A RhoA-GTP ligado estimula a sua cinase ROCK; A ROCK possui vários alvos: (6) Inibe a MLCP; (7) Fosforila a MLC; (8) Ativa a ZIPK; (9) A ZIPK fosforila diretamente a MLC; (10) A ZIPK fosforila a MLCP, inibindo-a; (11) A RhoA-GTP ligado estimula a PLD; (12) A PLD cliva o lípido de membrana PC em PA; (13) O PA é desfosforilado a DAG pela ação da enzima fosfolipase; (14) O DAG ativa a PKC, de maneira sustentada; (15) A PKC fosforila a CPI-17, ativando-a; (16) A CPI-17 inibe a ação da MLCP. Todos esses mecanismos favorecem o estado fosforilado a MLC e sua interação com os filamentos de actina, mantendo o músculo liso contraído. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Modificado de Ferreira (2018).

O relaxamento no músculo liso (Figura 6) ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de uma substância que inibe o mecanismo contrátil (MORGAN, 1990). A abertura de canais de K^+ por meio de estímulos, leva ao aumento do efluxo deste íon através da célula, produzindo assim, uma hiperpolarização da membrana das células musculares lisas (EDWARDS; WESTON, 1990; GURNEY, 1994), dessa forma, reduzindo o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v , a concentração deste íon no interior da célula e a contração muscular (REMBOLD, 1996).

Nos mecanismos de relaxamento do músculo liso através do acoplamento farmacomecânico estão envolvidos os agonistas que induzem este efeito por meio da ligação aos seus receptores que ativam diretamente uma ciclase de guanilil (GC), como o óxido nítrico (NO), ou de adenilil (AC), como a prostaciclina (PGI_2), resultando na formação do monofosfato cíclico de guanosina ($cGMP$) e monofosfato cíclico de adenosina ($cAMP$), respectivamente, que através da ativação ou inibição de diversos alvos, levará à diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ (REMBOLD, 1996). O aumento desses nucleotídeos cíclicos nas células musculares lisas resulta na ativação das suas respectivas proteínas cinases A e G (PKA e PKG) (PUETZ; LUBOMIROV; PFITZER, 2009). Estas levam a um aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA), aumentando o sequestro e a extrusão de Ca^{2+} , respectivamente. A PKA e PKG ativam também o trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX); promovem a inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo Ca^{2+} -CaM, causando uma redução nos níveis de MLC fosforilada; inibem diretamente os Ca_v , além de indiretamente, por ativação dos canais de K^+ que, por uma hiperpolarização, bloqueiam os Ca_v ; e a PKG leva também a inativação do IP_3R , reduzindo sua capacidade de liberar o Ca^{2+} do RS. Todos esses eventos culminam no relaxamento do músculo liso por redução da $[Ca^{2+}]_c$ (Figura 6) (WOODRUM; BROPHY, 2001; DUTTA et al., 2002; DANILA; HAMILTON, 2004).

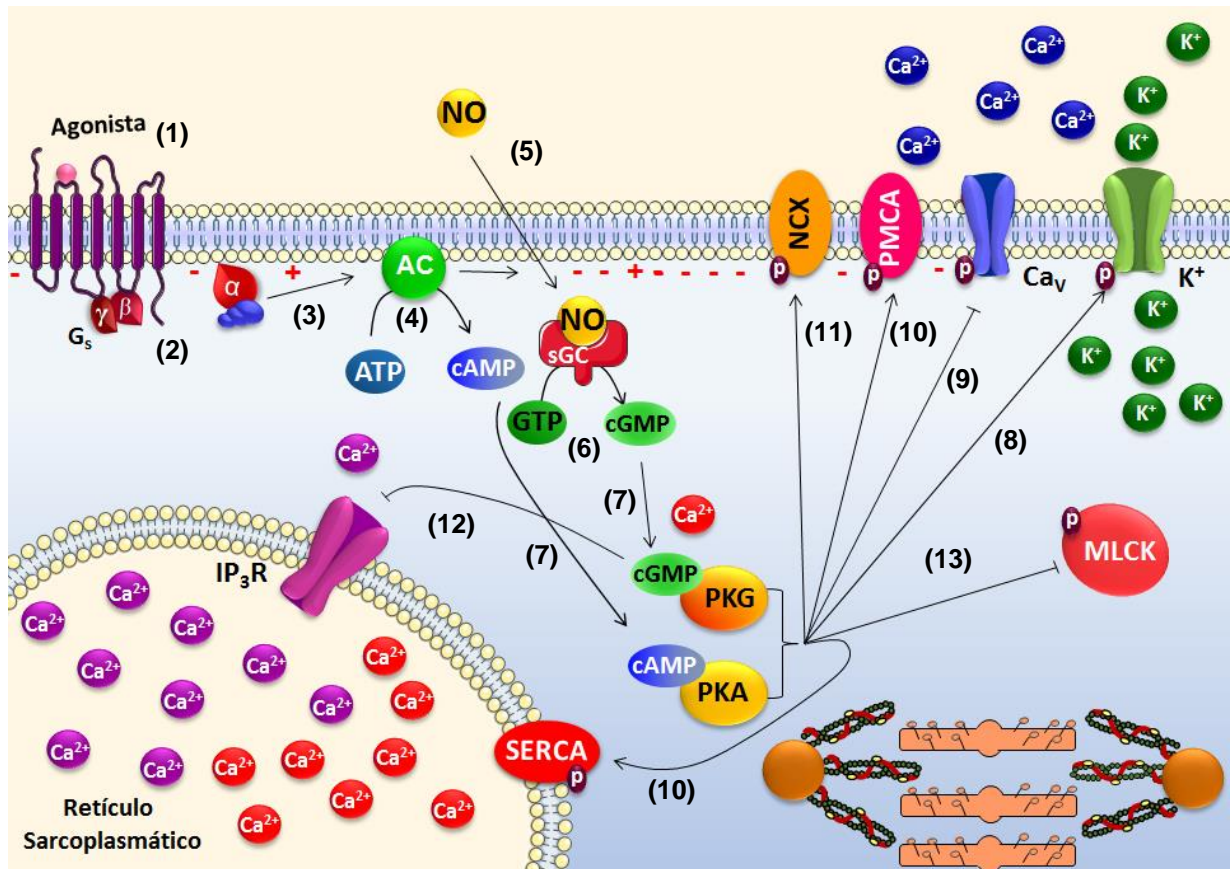
O endotélio vascular é considerado um órgão dinâmico que reveste o sistema vascular, composto por células endoteliais que respondem a hormônios, neurotransmissores e fatores que afetam a vasomotricidade, agregação plaquetária, inflamação e outros (GALLEY; WEBSTER 2004; SANDOO et al., 2010). O endotélio libera diversos compostos vasoativos que podem ser vasodilatadores, tais como o NO, PGI_2 e o EDHF ou fatores vasoconstritores, tais como o tromboxano A_2 e endotelina (CARVALHO et al., 2001).

O NO desempenha um papel fundamental na manutenção do tônus vascular. A biossíntese deste gás lipossolúvel é feita pela óxido nítrico sintase (NOS), uma enzima dimérica que catalisa a oxidação da L-arginina. São descritas três isoformas de NOS: a neuronal (nNOS), que regula a liberação de neurotransmissor, atuando como um mensageiro neuronal; a isoforma induzível (iNOS), expressa em uma variedade de tecidos de forma induzida por diferentes agentes biológicos; e NOS endotelial (eNOS), que é uma das principais fontes de NO encontradas no sistema cardiovascular (DUDZINSKI et al., 2006). A eNOS é uma enzima constitutiva ativada por um aumento na concentração intracelular de íons Ca^{2+} , induzido por agonistas como a acetilcolina, catecolaminas, ATP, substância P, angiotensina II, ou por estímulos físicos, como a força de cisalhamento (CARVALHO et al., 2001).

Inicialmente, o NO foi investigado com a função biológica de vasodilatador a partir dos estudos de Furchgott e Zawadzki (1980), que descreveram o fenômeno pelo qual a acetilcolina relaxava preparações dos vasos sanguíneos isolados somente se o endotélio vascular que reveste os vasos estivesse presente e intacto (MONCADA; HIGGS, 2006). Atualmente, sabe-se que este efeito ocorre pela ligação da acetilcolina aos receptores M_3 nas células endoteliais, que acoplam as proteínas $\text{G}_{q/11}$ e ativam a via $\text{PLC}\beta_1/\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ culminando com o aumento da produção de NO, ocasionando o relaxamento da célula muscular lisa (MONCADA et al., 1991; BRUNNING et al., 1994; GUEDES et al., 2004). Desta forma, a utilização de atropina, um antagonista competitivo não seletivo dos receptores muscarínicos (TROVERO et al., 1998; WALCH et al., 2000), é de grande valia como ferramenta farmacológica para a verificação da participação deste receptor no efeito relaxante de substâncias (AMEER et al., 2010).

Percebe-se então que uma substância que iniba qualquer ponto da via contrátil do músculo liso ou estimule o seu relaxamento, pode se tornar uma potencial droga espasmolítica para o tratamento de diversas desordens (PELAIA et al., 2002), como diarreia e cólicas intestinais (KIM et al., 2008), asma brônquica (WEBB, 2003) e hipertensão (UEHATA et al., 1997).

Figura 6 – Mecanismo do relaxamento no músculo liso vascular induzido pelas vias efectoras do cAMP e cGMP.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) a proteína G_s troca GDP por GTP na sua subunidade α (processo não mostrado na figura), tornando-se ativa; (3) a subunidade $G_{\alpha s}$ -GTP ativa a AC; (4) a AC converte o ATP em cAMP; (5) o NO gerado nas células endoteliais estimula a atividade da sGC; (6) a sGC converte o GTP em cGMP; (7) os nucleotídeos cíclicos, cAMP e cGMP, ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG. Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos: (8) ativam os canais de K^+ ; (9) inibem os Ca_v ; (10) aumentam a atividade da SERCA e da PMCA; (11) ativam o NCX; (12) A PKG inibe os IP_3R . Todos esses mecanismos diminuem a $[Ca^{2+}]_c$; (13) inibem a MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo $4Ca^{2+}$ -CaM. Todos esses mecanismos impedem a fosforilação da MLC e, conseqüentemente, a interação dos filamentos de miosina com os de actina, promovendo o relaxamento do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: FERREIRA, 2018.

1.7 Hipertensão

As doenças cardiovasculares são consideradas um problema de saúde pública e podem ser definidas como um grupo de doenças que afetam o coração e os vasos sanguíneos. Entre elas estão incluídas as doenças coronariana cardíaca, cerebrovascular, arterial periférica, reumática cardíaca, congênita cardíaca, trombose, embolia pulmonar e hipertensão. Estas doenças são a principal causa de óbito atualmente. Aproximadamente 17,7 milhões de pessoas morrem todos os anos em sua decorrência, sendo 31% de todas as mortes globais (WHO, 2017c).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença de caráter poligênico e multifatorial. Trata-se de níveis elevados e sustentados da pressão arterial, usualmente associado a alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo: coração, encéfalo, rins, vasos sanguíneos e alterações metabólicas (BRASIL, 2016). Fisiologicamente, a pressão sanguínea apresenta uma variação considerada normal, porém valores mais altos do que estes configuram um quadro de hipertensão. Em muitos casos, é considerado hipertenso o indivíduo com pressão sistólica sanguínea sustentada e superior à 140 mmHg e/ou valores de pressão diastólica acima de 90 mmHg (KJELDSEN, 2017).

De acordo com a OMS, a hipertensão afeta cerca de um bilhão de pessoas em todo o mundo e contribui para aproximadamente 9,4 milhões de mortes por doenças cardiovasculares a cada ano. Além disso, estima-se que até o ano 2030, 23 milhões de mortes cardiovasculares são projetados para serem devido à hipertensão (WHO, 2015). No Brasil, a hipertensão atinge 32,5% (36 milhões) de indivíduos adultos, mais de 60% dos idosos, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por doença cardiovascular (SCALA; MAGALHÃES; MACHADO, 2015).

A pressão arterial é definida como o produto do débito cardíaco pela resistência vascular periférica total. A resistência ao fluxo sanguíneo na circulação é regulado principalmente pelo tônus vascular (SANTOS et al., 2007), que portanto irá regular a pressão arterial e distribuição do fluxo sanguíneo entre os tecidos e órgãos do corpo. O tônus vascular, por sua vez, é regulado por hormônios circulantes, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio, sinais elétricos e/ou mecânicos, como a própria pressão sanguínea, além dos canais iônicos (JACKSON, 2000). Dessa forma, as propriedades mecânicas dos vasos sanguíneos periféricos

desempenham papel importante no controle circulatório, tanto em condições fisiológicas quanto em patológicas (EIKEN et al., 2014; JOYNER; LIMBERG, 2014).

Os vasos sanguíneos apresentam três camadas ou túnicas: a adventícia que é a camada mais externa, composta por tecido conjuntivo frouxo e que recebe os nervos; a camada média em posição intermediária, que contém células musculares lisas dispostas circularmente, fibras colágenas e elastina; e a camada íntima, que fica em contato com o sangue, composta por células endoteliais que revestem a porção interna do vaso e uma lâmina subendotelial (SEIDELMANN; LIGHTHOUSE; GREIF, 2014).

As células endoteliais, em condições fisiológicas, são controladas por fatores hemodinâmicos, como a pressão arterial e o fluxo sanguíneo, que levam a uma resposta dependente da produção de mediadores químicos, e que produzem modificações no fluxo sanguíneo (PRATI et al., 2014). Essas células desempenham um papel fundamental na regulação do tônus vascular através da síntese e liberação de fatores de relaxamento e contração envolvidos na homeostase cardiovascular (PEREIRA et al., 2011). Os principais fatores relaxantes derivados do endotélio são o NO, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a PGI_2 . Entre os fatores contráteis, os principais são a prostaglandina H_2 , o tromboxano A_2 , a angiotensina II, a endotelina-1 e os ânions superóxido ou espécies reativas de oxigênio (CARVALHO et al., 2001).

O tratamento farmacológico da hipertensão abrange uma grande diversidade de classes de medicamentos, alguns deles exercem seu mecanismo de ação diretamente sobre o músculo liso vascular, seja impedindo a contração como são os bloqueadores de canais de cálcio (anlodipino, nifedipino), antagonistas do receptor da angiotensina (losartana) ou estimulando o relaxamento, como doadores de NO (nitruprussiato de sódio) (BRASIL, 2016; CUSPIDI et al., 2017).

Também existem relatos da utilização de plantas medicinais para o tratamento da hipertensão, dentre elas *Allium sativum* L. (“alho”), *Aloe vera* (L.) Burm.f (“babosa”), *Piper nigrum* L. (“pimenta do reino”), *Cassia fistula* L. (“cassia-imperial”), *Senna siamea* (Lam.) H.S.Irwin & Barneby (“cassia-de-sião”), entre outras (NEAMSUVAN; KOMONHIRAN; BOONMING, 2018).

As doenças cardiovasculares são multifatoriais, portanto, moléculas capazes de atingir mais de um mecanismo envolvido na fisiopatologia dessas doenças, representam excelentes oportunidades para o desenvolvimento de novas drogas

eficazes, de maneira que os flavonoides satisfazem este requisito (ALMEIDA-REZENDE et al., 2016).

Diante do exposto e com base no fato de que o extrato etanólico obtido das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* (ZB-EtOH_{PA}) apresentou atividade espasmolítica em diversos modelos de músculo liso (OLIVEIRA et al., 2014 2016a,b), além de que o flavonoide isolado deste extrato, 5,7-DMF, apresentou efeito tocolítico em ratas (FERREIRA, 2018), este trabalho objetivou realizar uma triagem farmacológica da atividade espasmolítica em músculos fásicos e tônicos com esse flavonoide, caracterizando o mecanismo de ação vasorrelaxante proposto para a 5,7-DMF já descrito na literatura (TEP-AREENAN; SAWASDEE; RANDALL, 2010). Dessa forma, podendo propiciar subsídios científicos na busca de produtos derivados de plantas para uso na terapêutica.

2 Objetivos

2.1 Gerais

Avaliar e comparar a atividade espasmolítica da 5,7-DMF em músculos lisos, fásicos e tônicos, e caracterizar melhor o mecanismo de ação vasorrelaxante em anéis de aorta isolados de rato.

2.2 Específicos

- Determinar e comparar a potência e a eficácia farmacológicas relativas do flavonoide em:
 - Íleo de cobaia;
 - Traqueia de cobaia;
 - Aorta de Rato.

- Caracterizar o efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF em anéis isolados de aorta de rato, avaliando o envolvimento de:
 - Receptores muscarínicos;
 - Fatores relaxantes derivados do endotélio;
 - Canais de K^+ ;
 - Canais de cálcio dependente de voltagem.

3 Material e métodos

3.1 Material

3.1.1 Material botânico

As partes aéreas de *Zornia brasiliensis* foram coletadas no município de Serra Branca-PB em setembro de 2009, e identificadas pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do Setor de Botânica da Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Professor Lauro Pires Xavier, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da UFPB sob o código AGRA-6833.

3.1.2 Drogas-teste

Para a realização desta pesquisa era utilizada a 5,7-DMF, que foi gentilmente cedida pela equipe dos Professores Dr. Josean Fachine Tavares e Dr. Marcelo Sobral da Silva do PgPNSB da UFPB. Inicialmente, as partes aéreas de *Zornia brasiliensis* foram secas em estufa com ar circulante à temperatura de 45 °C durante 72 horas. Após a secagem, o material foi pulverizado em moinho mecânico, obtendo-se o pó. Em seguida, o pó foi submetido a uma maceração exaustiva com etanol (EtOH) 95% por 72 horas, em macerador de aço inoxidável, sendo esse processo repetido por quatro vezes, obtendo-se a solução extrativa. Esta foi concentrada sob pressão reduzida, em evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C para eliminação do solvente, obtendo-se o extrato etanólico bruto, do qual retirou-se uma alíquota que foi submetida a uma cromatografia líquida à vácuo com o solvente diclorometano. A fração resultante desse processo foi concentrada em rotaevaporador, obtendo-se 20,0 g da fase diclorometano que por processos fitoquímicos resultou no isolamento da 5,7-dimetoxifavona.

3.1.3 Animais

Eram utilizados cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos e ratos Wistar, pesando $419,9 \pm 19,0$ e $304,5 \pm 3,5$ g, respectivamente, todos provenientes do

Biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da UFPB.

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Presence[®]) com livre acesso a água, com ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 06h00 às 18h00. Os experimentos eram realizados no período de 08h00 às 20h00. Todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB sob o número 129/2016 (Anexo 1).

3.1.4 Substâncias e reagentes

O cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), o bicarbonato de sódio (NaHCO_3), o cloreto de potássio (KCl), o fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), o fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4), o cloreto de sódio (NaCl), o ácido clorídrico (HCl), o hidróxido de sódio (NaOH) e o cloreto de magnésio di-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram obtidos da Vetec (Brasil).

O diidrocloridrato de histamina, o cloridrato de carbamilcolina (CCh), o ácido araquidônico (AA), o cloridrato de L(-)-fenilefrina (FEN), o cloridrato de acetilcolina (ACh), o N_ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), a L-arginina, a 1H-[1,2,4], o Rp 8-Bromo- β -fenil-1, N^2 -etenoguanosina-3', 5'- monofosforotiotato cíclico (Rr-8-Br-PET-cGMPS), e o Cremophor[®] foram obtidos da Sigma-Aldrich (Brasil). O 1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-trifluorometil]fenil]3-piridina carboxílico ácido metil éster (S-(-)-Bay K8644) foi obtido da Santa Cruz Biotechnology. A mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) foi obtida da White Martins (Brasil).

Todas as substâncias foram mantidas em um “freezer” à temperatura de 4-8 °C, dissolvidas e diluídas em água destilada, exceto o S-(-)-Bay K8644 que foi dissolvido em etanol absoluto para obtenção da solução-estoque, sendo este último mantido ao abrigo da luz.

3.1.5 Soluções nutritivas

De acordo com os experimentos realizados, eram utilizadas várias soluções nutritivas (ajustadas ao pH 7,4, com uma solução de HCl ou NaOH 1N), todas gaseificadas com carbogênio e mantidas a 37 °C, cujas composições estão descritas abaixo:

Composição da solução de Krebs modificado por Sun e Benishin (1994) (mM): NaCl (117,0), KCl (4,7), MgSO₄ (1,3), NaH₂PO₄ (1,2), CaCl₂ (2,5), glicose (11,0) e NaHCO₃ (25,0).

Solução de Krebs (mM): NaCl (118,0), KCl (4,5), MgSO₄ (5,7), KH₂PO₄ (1,1), CaCl₂ (2,5), glicose (11,0) e NaHCO₃ (25,0).

Solução de Krebs despolarizante com 30 mM de KCl (mM): NaCl (92,5), KCl (30,0), MgSO₄ (5,7), KH₂PO₄ (1,1), CaCl₂ (2,5), glicose (11,0) e NaHCO₃ (25,0).

Solução de Krebs despolarizante com 80 mM de KCl (mM): NaCl (42,5), KCl (80,0), MgSO₄ (5,7), KH₂PO₄ (1,1), CaCl₂ (2,5), glicose (11,0) e NaHCO₃ (25,0).

Solução de Krebs despolarizante nominalmente sem cálcio (mM): NaCl (42,5), KCl (80,0), MgSO₄ (5,7), KH₂PO₄ (1,1), glicose (11,0) e NaHCO₃ (25,0).

3.1.6 Preparação das soluções-mãe do flavonoide para os ensaios farmacológicos

O flavonoide era solubilizado em Cremophor[®] e diluído em água destilada para obtenção da solução-estoque (10⁻² M, 3% Cremophor[®] v/v) que era estocada a uma temperatura de 0 °C. A concentração final de Cremophor[®] na cuba nunca excedeu 0,01%. Nesta concentração o Cremophor[®] é desprovido de efeito contrátil ou relaxante significativo no órgão estudado, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores.

Na triagem farmacológica, as concentrações do flavonoide eram utilizadas em múltiplos de 3, sendo a concentração submáxima 10⁻⁴ M e a máxima 3 x 10⁻⁴ M. Quando na concentração submáxima o efeito observado ultrapassou 50% e na

concentração máxima o efeito observado ultrapassou 70%, houve a determinação de uma curva concentrações-resposta completa testando concentrações menores para verificar o zero e o efeito máximo (E_{\max}) dos flavonoides.

3.1.7 Aparelhos

Para o registro das contrações isotônicas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (5 mL) e conectados a uma alavanca isotônica de inscrição frontal em cilindros esfumaçados de um quimógrafo (DTF, Brasil). A temperatura das cubas era controlada com bombas termostáticas (BANHO-MARIA AVS-BM, Brasil, ou POLYSTAT 12002, Cole-Palmer, EUA).

Para registrar as contrações isométricas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (6 mL) modelo BOI-04 e conectados a transdutores de força isométricos modelo TIM 05 acoplados a um amplificador modelo AECAD04F. Este, por sua vez, era conectado a um sistema de aquisição digital com o software AQCAD versão 2.1.6 para aquisição dos dados e ANCAD para análise. O sistema contém uma bomba termostática modelo BT-60 que controla a temperatura das cubas. Todos os aparelhos foram adquiridos da AVS Projetos (São Paulo-SP, Brasil).

Todas as substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG200 e os animais em balança semianalítica modelo BG4001, ambas da Gehaka (Brasil).

Os valores de pH eram verificados através de um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil).

3.2 Métodos

3.2.1 Triagem farmacológica preliminar

3.2.1.2 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona frente às contrações fásicas induzidas por CCh ou por histamina em íleo isolado de cobaia

Os cobaias eram mantidos em jejum por um período de 18 horas, tendo acesso à água *ad libitum* antes do início dos experimentos. Após este período eram eutanasiados por decapitação com o auxílio de uma guilhotina. O abdômen era

aberto e um segmento do íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento era retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs modificado a 37 °C gaseificados com carbogênio.

Após cuidadosa dissecação, o segmento do íleo era seccionado em fragmentos de 2 a 3 cm de comprimento, suspensos individualmente em cubas de vidro e deixados em repouso por 30 minutos, tempo necessário para perfeita estabilização da preparação, durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 15 minutos. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 40 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos duas contrações fásicas de magnitudes similares, com intervalo de 15 minutos entre ambas, eram obtidas com 10^{-6} M de CCh ou de histamina, concentração submáxima que produz cerca de 80% da resposta máxima, e registradas através de uma alavanca isotônica de inscrição frontal acoplada ao cilindro esfumaçado de um quimógrafo. O flavonoide era incubado em pelo menos 3 concentrações por 15 minutos em preparações diferentes, e na presença deste, era induzida uma terceira contração utilizando um dos agonistas acima citados em preparações diferentes (DANIEL; KWAN; JANSSEN, 2001).

A inibição da resposta contrátil induzida por CCh ou por histamina foi avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição da 5,7-DMF à cuba, sendo sua eficácia expressa como E_{max} (efeito máximo). Os valores de CI_{50} (concentração da substância que inibe 50% do efeito máximo de um agonista) foram expressos como a média e e.p.m. (erro padrão da média) dos valores individuais da CI_{50} obtidos em cada um dos experimentos e calculados por regressão não linear.

O tempo de reversão do efeito espasmolítico do flavonoide era observado após a retirada do mesmo na concentração máxima utilizada.

3.2.1.3 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em traqueia isolada de cobaia

Os cobaias, após serem eutanasiados por decapitação com o auxílio de uma guilhotina, tinham a traqueia retirada e limpa, de modo a separá-la de todo o tecido conectivo e adiposo. O órgão era dividido em segmentos, contendo de 3 a 4 anéis de cartilagem. Os segmentos eram suspensos individualmente através de hastes de aço inoxidável em cubas de banho (6 mL), contendo solução nutritiva de Krebs sob

tensão de 1 grama. Estes segmentos eram mantidos a uma temperatura de 37 °C e permaneceram em repouso durante 60 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos.

Após o período de estabilização era induzida uma contração com 10^{-6} M de CCh, e durante o componente tônico era adicionado 10^{-4} M de AA para verificar a integridade do epitélio. O epitélio era considerado íntegro quando os anéis de traqueia apresentaram relaxamento igual ou superior a 50%. Em relaxamento igual ou inferior a 10%, os anéis eram considerados sem epitélio funcional. Após a lavagem, esperou-se 30 minutos e durante o componente tônico de uma segunda resposta ao agonista, o flavonoide era adicionado em preparações diferentes de maneira cumulativa à cuba (TSCHIRHART et al., 1987).

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por CCh e os valores de CE_{50} (concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo) foram calculados por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta obtida para o flavonoide em anéis com e sem epitélio funcional.

Após o relaxamento máximo do flavonoide, o tempo de reversão era observado.

3.2.1.4 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre as contrações tônicas induzidas por FEN em aorta isolada de rato

Os ratos eram eutanasiados por decapitação com o auxílio de uma guilhotina. Um segmento da aorta torácica era retirado e limpo de todo o tecido conjuntivo e adiposo, em seguida, era seccionado em anéis de 3-5 mm. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis eram suspensos individualmente por uma alça de aço inoxidável, em cubas de banho (6 mL) contendo solução de Krebs a 37 °C. As preparações eram estabilizadas por um período de 60 minutos, durante o qual eram mantidas sob uma tensão de repouso de 1 grama e gaseificados com carbogênio. Durante esse período, a solução nutritiva era renovada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Após o período de estabilização era induzida uma contração com 3×10^{-7} M de FEN e durante o componente tônico era adicionado 10^{-6} M de ACh para verificar a integridade do endotélio (FURCHGOTT; ZAWDZKI, 1980). O endotélio vascular

era considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentassem relaxamento igual ou superior a 50%. Em relaxamento igual ou inferior a 10%, os anéis eram considerados sem endotélio funcional (AJAYA; GILANI; MUSTAFAA, 2003). Após a lavagem, esperou-se 30 minutos e durante o componente tônico de uma segunda resposta ao agonista, o flavonoide era adicionado em preparações diferentes de maneira cumulativa à cuba.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração induzida por FEN. Os valores de CE_{50} foram obtidos por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta obtidas para o flavonoide em anéis com e sem endotélio funcional.

Após o relaxamento máximo do flavonoide, o tempo de reversão era observado.

3.2.2 Investigação do mecanismo de ação vasorrelaxante da 5,7-dimetoxiflavona em aorta isolada de rato

3.2.2.1 Avaliação do envolvimento do receptor muscarínico no efeito vasorrelaxante produzido pela 5,7-dimetoxiflavona

3.2.2.1.1 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na ausência e na presença de atropina

A aorta era montada como descrito anteriormente. Após o período de estabilização em solução de Krebs e verificação da presença de endotélio, os anéis de aorta eram incubados com 10 μ M de atropina, antagonista não-seletivo competitivo dos receptores muscarínicos (adaptado de ZIYYAT et al., 2002). Após 30 minutos, uma contração com 3×10^{-7} M de FEN era induzida e sobre o componente tônico era adicionado o flavonoide de maneira cumulativa.

O relaxamento produzido pelo flavonoide foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de CE_{50} do flavonoide foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença do antagonista.

3.2.2.2 Confirmação do envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito vasorrelaxante produzido pela 5,7-dimetoxiflavona

3.2.2.2.1 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na ausência e na presença de L-NAME e de L-arginina

A aorta era montada como descrito no item 3.2.1.4. Após o período de estabilização em solução de Krebs e verificação da presença de endotélio, os anéis de aorta eram incubados com 10^{-4} M de L-NAME (REES et al., 1990), inibidor não seletivo competitivo da sintase do NO. Após 30 minutos, uma contração com 3×10^{-7} M de FEN era induzida e sobre o componente tônico o flavonoide era adicionado de maneira cumulativa.

A reversibilidade do efeito inibitório do L-NAME era demonstrada pela adição de 10^{-3} M de L-arginina, substrato para NOS, na presença e na ausência de L-NAME, permanecendo na cuba por 30 minutos antes da contração com o agonista (REES et al., 1990).

O relaxamento produzido pelo flavonoide foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de CE_{50} da 5,7-DMF foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença das ferramentas farmacológicas utilizadas.

3.2.2.3 Avaliação da participação da proteína cinase dependente de cGMP (PKG) na ação vasorrelaxante da 5,7-dimetoxiflavona

3.2.2.3.1 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS

A aorta era montada como descrito no item 3.2.1.4. Após o período de estabilização em solução de Krebs e verificação da presença de endotélio, os anéis de aorta eram incubados com 3×10^{-5} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS, inibidor competitivo da PKG (IBARRA-ALVORADO et al., 2002). Após 30 minutos, uma contração com 3×10^{-7} M de FEN era induzida e sobre o componente tônico o flavonoide era adicionado de maneira cumulativa.

O relaxamento produzido pelo flavonoide foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de CE_{50} do flavonoide foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença do bloqueador.

3.2.2.4 Avaliação da participação dos canais de potássio ou de cálcio dependente de voltagem no efeito vasorrelaxante produzido pela 5,7-dimetoxiflavona

3.2.2.4.1 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou 80 mM de KCl

A aorta era montada como descrito no item 3.2.1.4. Após o período de estabilização em solução de Krebs e verificação da presença de endotélio, a solução de Krebs era trocada por solução contendo 30 ou 80 mM de KCl, induzindo uma contração (GURNEY, 1994) e sobre o componenteônico desta contração o flavonoide era adicionado de maneira cumulativa.

O relaxamento do flavonoide foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por KCl, e os valores de E_{max} da 5,7-DMF foram obtidos para contrações induzidas por solução de 30 e 80 mM de KCl. Os valores de CE_{50} foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta obtidas para 5,7-DMF com a solução de 30 ou 80 mM de KCl.

3.2.2.4.2 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona frente às contrações cumulativas induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+}

A aorta era montada como descrito no item 3.2.1.4. Após o período de estabilização e verificação da presença de endotélio, a solução de Krebs era substituída pela solução despolarizante (KCl 80 mM) nominalmente sem Ca^{2+} durante um período de 45 minutos. Durante esse tempo, a preparação era lavada a cada 15 minutos. Eram induzidas duas curvas concentrações-resposta cumulativas ao $CaCl_2$ e em seguida, o flavonoide era incubado em pelo menos 3 concentrações, na ausência de $CaCl_2$ por 15 minutos e, após esse período, uma terceira curva

concentrações-resposta cumulativa ao CaCl_2 era obtida na presença do flavonoide (VAN ROSSUM, 1963).

Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença do flavonoide com a obtida pela amplitude média das curvas controle na ausência do flavonoide. O efeito inibitório do flavonoide foi avaliado com base na análise dos valores do E_{max} e da CE_{50} do CaCl_2 calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença do flavonoide.

3.2.2.4.3 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre as contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644

A aorta era montada como descrito no item 3.2.1.4. Após o período de estabilização em solução de Krebs e verificação da presença de endotélio, era induzida uma contração com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (YUZURIHARA et al., 2002), um agonista seletivo dos Ca_v do tipo L ou Ca_v1 (FERRANTE et al., 1989). Após a estabilização dessa contração, o flavonoide era adicionado de maneira cumulativa à cuba. Os valores de CE_{50} foram obtidos por regressão não-linear a partir da curva concentrações-resposta obtidas para o flavonoide.

3.3 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como a percentagem da média e o erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” (dois grupos) ou análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido do pós-teste de Tukey (múltiplos grupos). A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$. Os valores de CE_{50} foram calculados por regressão não linear. Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism® versão 5.01.

4 Resultados

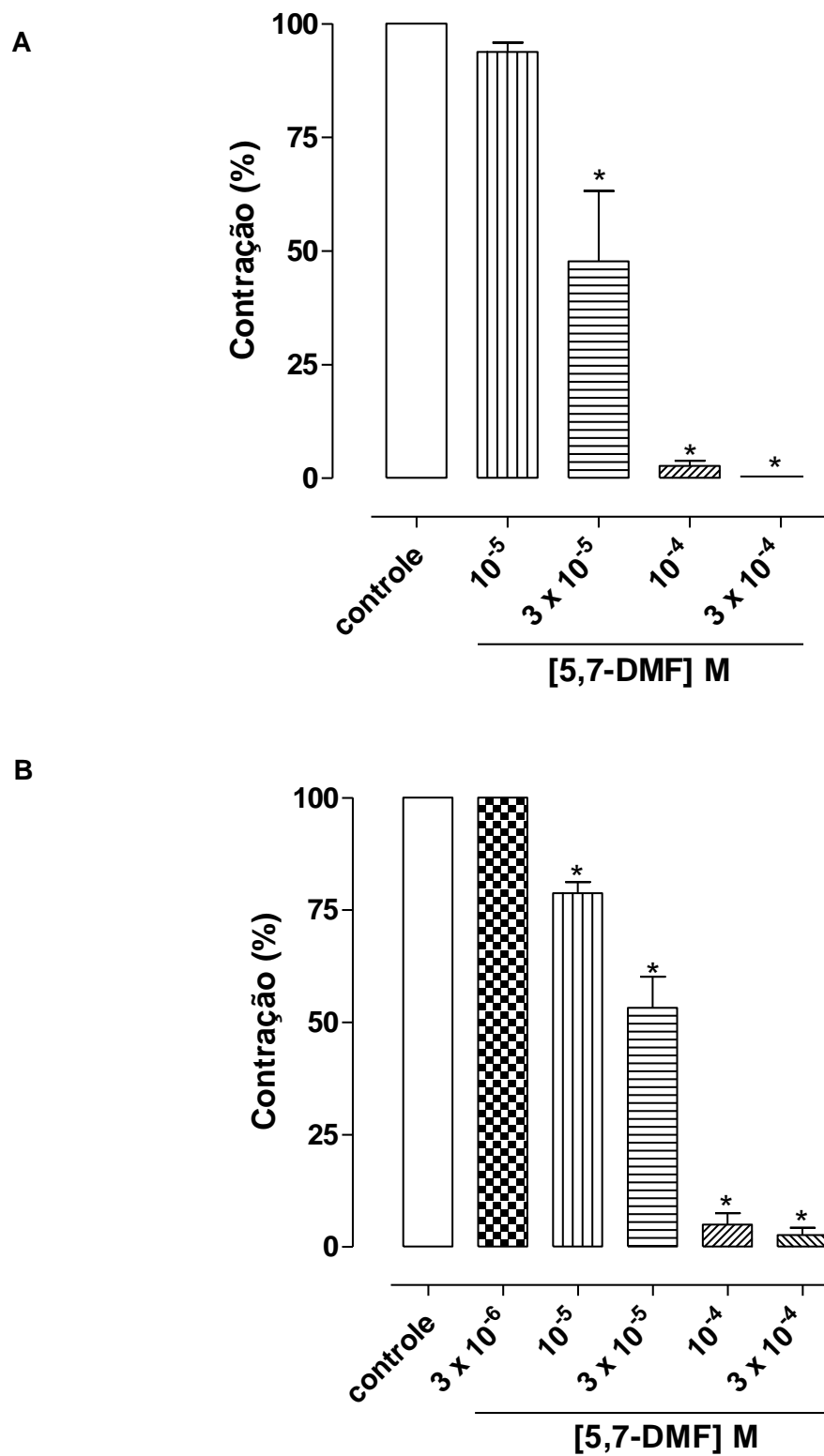
4.1 Triagem farmacológica preliminar

4.1.1 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona frente às contrações fásicas induzidas por histamina ou por CCh em íleo isolado de cobaia

A 5,7-DMF (3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M; $n = 5$) antagonizou de maneira dependente de concentração as contrações fásicas induzidas tanto por 10^{-6} M de CCh ($E_{\max} = 98,5 \pm 1,0\%$ e $CI_{50} = 3,2 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M) como de histamina ($E_{\max} = 95,0 \pm 2,6\%$ e $CI_{50} = 9,9 \pm 1,4 \times 10^{-6}$ M), sendo cerca de 3 vezes mais potente em inibir as contrações fásicas induzidas pela histamina (Gráfico 1).

A responsividade do íleo à histamina e ao CCh foi restaurada em 60 minutos após a retirada do flavonoide da cuba.

Gráfico 1 – Efeito da 5,7-DMF frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de CCh (A) ou de histamina (B) em íleo isolado de cobaia.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).
 * $p < 0,05$ (Controle vs 5,7-DMF).

Fonte: Autor, 2018.

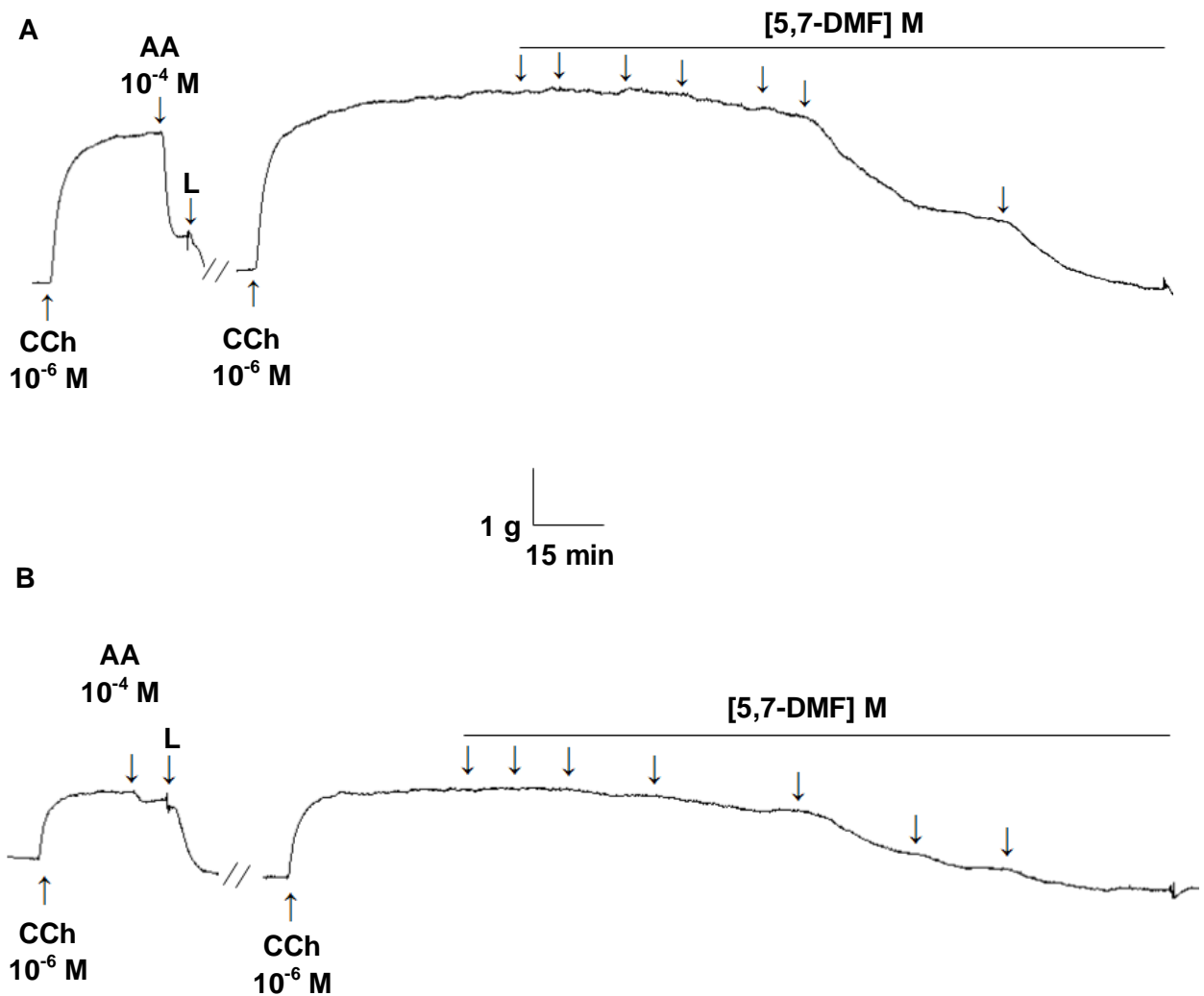
4.1.2 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em traqueia isolada de cobaia

A 5,7-DMF (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M; $n = 5$) relaxou de maneira equipotente e dependente de concentração a traqueia de cobaia pré-contraída com CCh tanto na presença ($E_{\max} = 122,4 \pm 9,5\%$ e $CE_{50} = 2,4 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M) quanto na ausência ($E_{\max} = 111,4 \pm 8,3\%$ e $CE_{50} = 2,6 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M) de epitélio funcional (Figura 7 e Gráfico 2).

A responsividade da traqueia ao CCh na presença e na ausência de epitélio funcional, foi restaurada em 90 e $92,5 \pm 7,5\%$, respectivamente, em 2 horas após a retirada do flavonoide da cuba.

O tempo médio para que a 5,7-DMF (10^{-7} a 10^{-4} M) alcançasse o seu efeito relaxante máximo total era cerca de 3 horas, tanto na presença quanto na ausência de epitélio funcional.

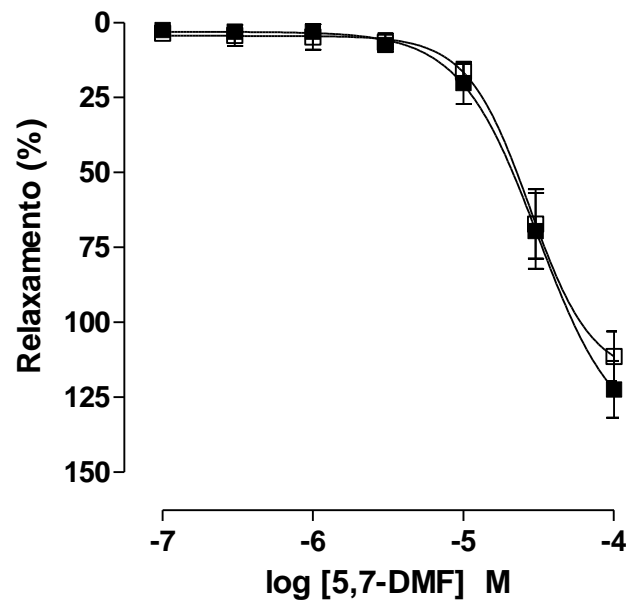
Figura 7 – Registros originais representativos do efeito relaxante da 5,7-DMF em traqueia isolada de cobaia pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas da 5,7-DMF (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M) adicionadas às cubas. CCh = carbacol, AA = ácido aráquidônico, L = lavagem, 5,7-DMF = 5,7-dimetoxiflavona.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 2 – Efeito relaxante da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na presença (■) e na ausência (□) de epitélio funcional.



Os símbolos representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$).

Fonte: Autor, 2018.

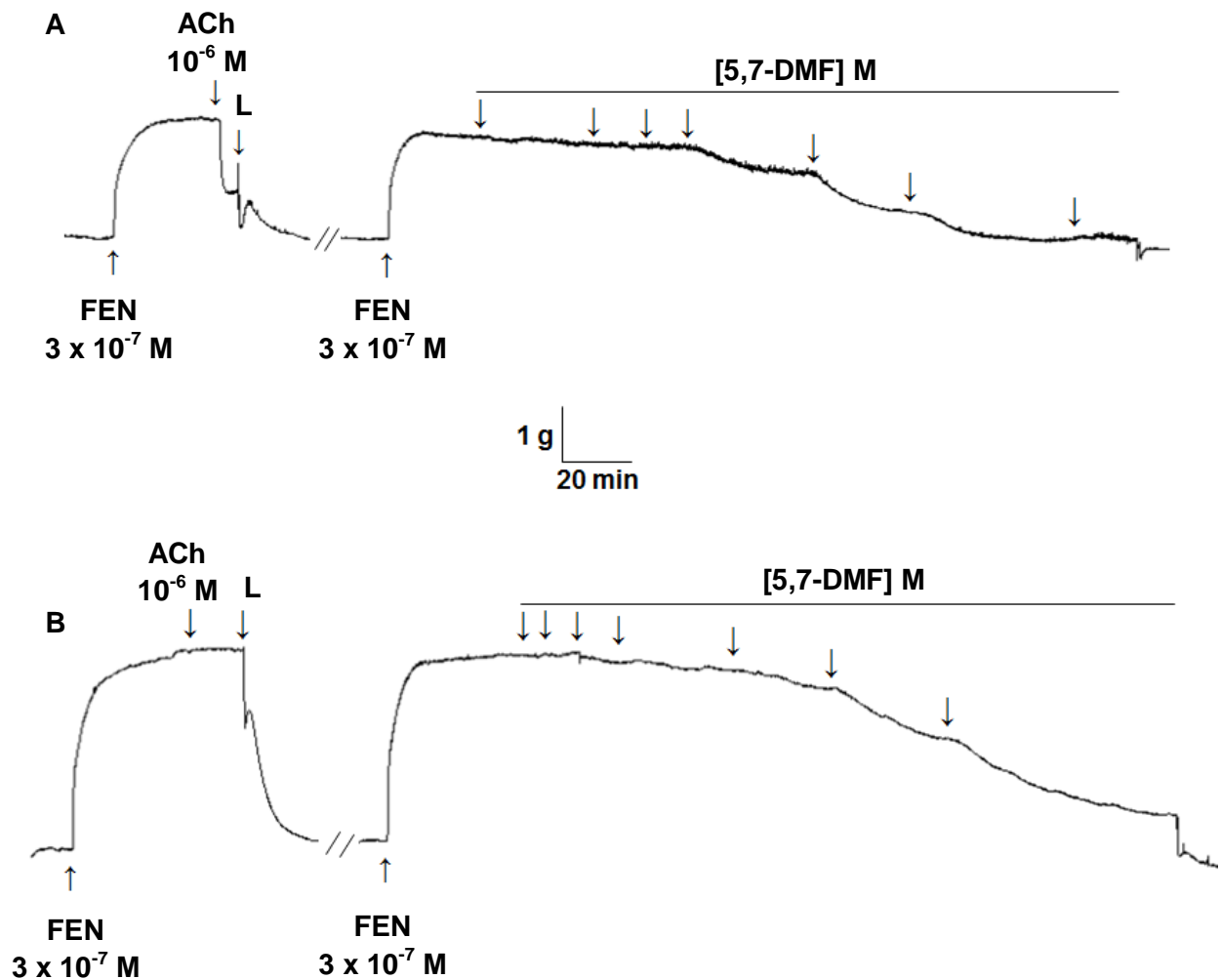
4.1.3 Efeito da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por FEN em aorta isolada de rato

A 5,7-DMF (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M) relaxou de maneira dependente de concentração a aorta isolada de rato pré-contraída com FEN, tanto na presença ($E_{\max} = 103,2 \pm 1,9\%$ e $CE_{50} = 4,5 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ M) quanto na ausência ($E_{\max} = 101,5 \pm 9,2\%$ e $CE_{50} = 1,7 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) de endotélio funcional, porém sendo cerca de 4 vezes mais potente na presença do endotélio funcional (Figura 8 e Gráfico 3).

A responsividade da aorta à fenilefrina com e sem endotélio funcional, foi restaurada ($91,0 \pm 4,5$ e $73,3 \pm 8,8\%$ respectivamente) em 2 horas após a retirada do flavonoide da cuba.

O tempo médio para que a 5,7-DMF (10^{-7} a 10^{-4} M) alcançasse o seu efeito vasorrelaxante máximo total era cerca de 3 horas, tanto na presença quanto na ausência de endotélio funcional.

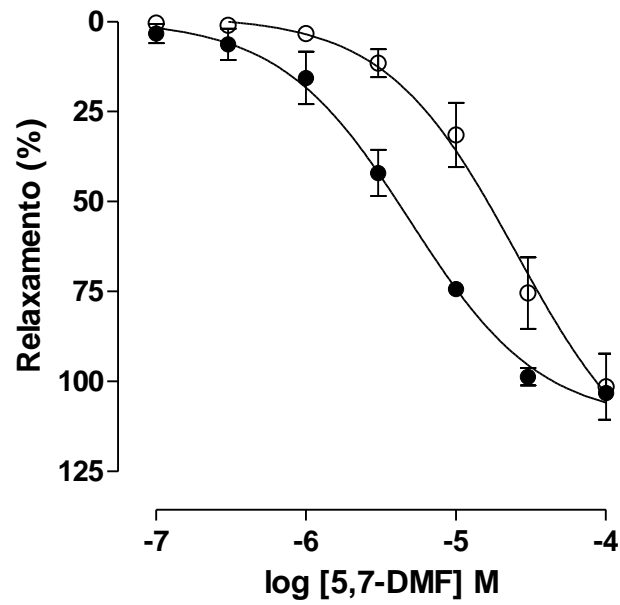
Figura 8 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta isolada de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas da 5,7-DMF (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M) adicionadas às cubas. FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem, 5,7-DMF = 5,7-dimetoxiflavona.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 3 – Efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na presença (●) e na ausência (○) de endotélio funcional.



Os símbolos representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$).

Fonte: Autor, 2018.

Tabela 1 – Valores de E_{\max} e CE_{50} da 5,7-DMF em músculos lisos fásicos e tônicos.

Órgão isolado	Agente contrátil	Endotélio/Epitélio	CI_{50}/CE_{50} (M)
Íleo de cobaia	CCh	-	$3,2 \pm 0,5 \times 10^{-5}$
	Histamina	-	$9,9 \pm 1,4 \times 10^{-6} *$
Traqueia de cobaia	CCh	Presença	$2,4 \pm 0,4 \times 10^{-5}$
		Ausência	$2,6 \pm 0,4 \times 10^{-5}$
Aorta de rato	FEN	Presença	$4,5 \pm 0,7 \times 10^{-6} **$
		Ausência	$1,7 \pm 0,3 \times 10^{-5}$

ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey. $*p < 0,05$ (histamina vs. CCh; ausência vs. presença); $^{#}p < 0,05$ (Aorta vs. íleo/traqueia) (n = 5).

Fonte: Autor, 2018.

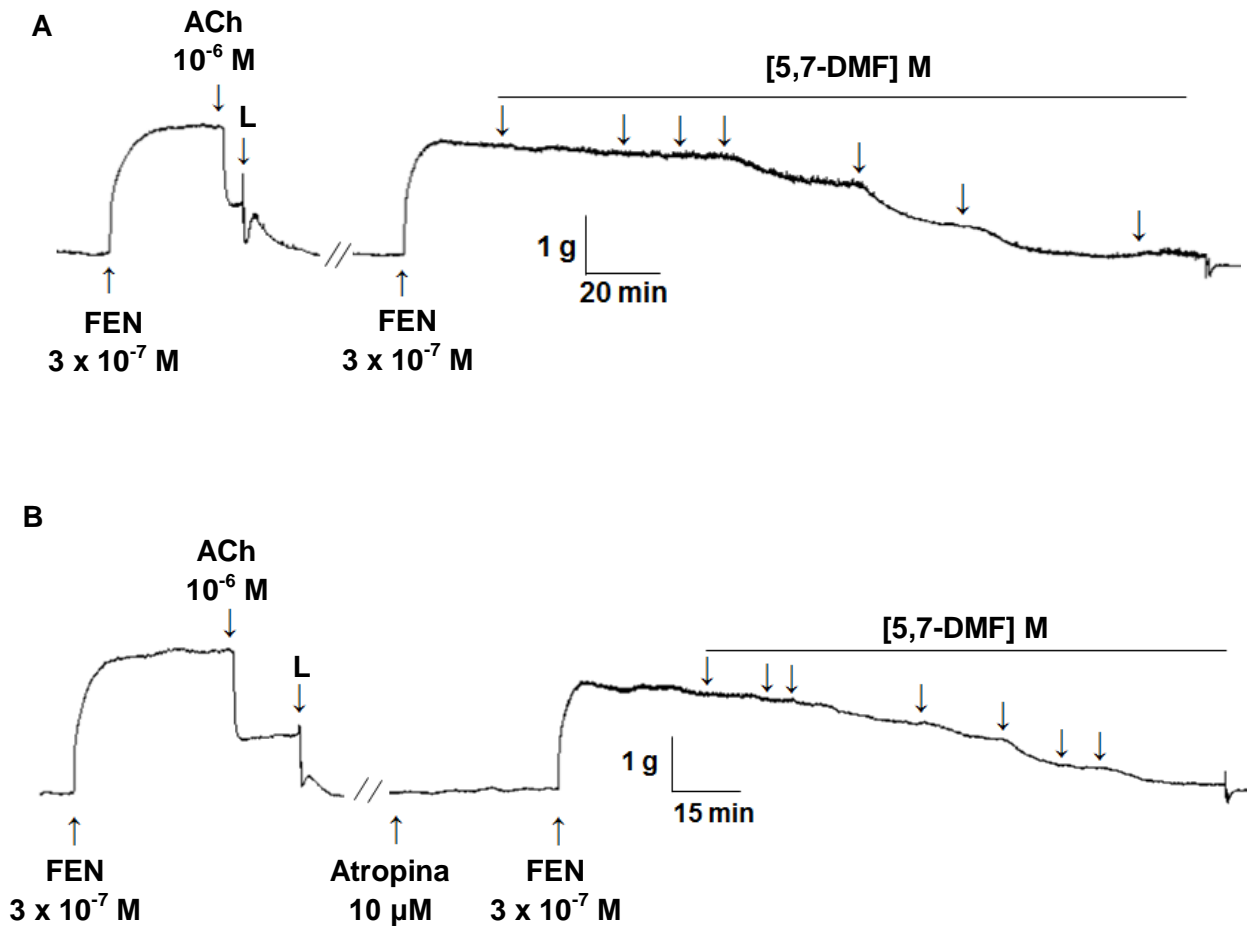
4.2 Investigação do mecanismo de ação vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta isolada de rato

4.2.1 Avaliação do envolvimento do receptor muscarínico no efeito relaxante produzido pela 5,7-DMF

4.2.1.1 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na ausência e na presença de atropina

A curva de relaxamento da 5,7-DMF ($E_{\max} = 103,2 \pm 1,9\%$ e $CE_{50} = 4,5 \pm 0,7 \times 10^{-6} \text{ M}$) não foi desviada na presença de $10 \mu\text{M}$ de atropina ($E_{\max} = 97,1 \pm 2,7\%$ e $CE_{50} = 3,8 \pm 0,7 \times 10^{-6} \text{ M}$) (Figura 9 e Gráfico 4).

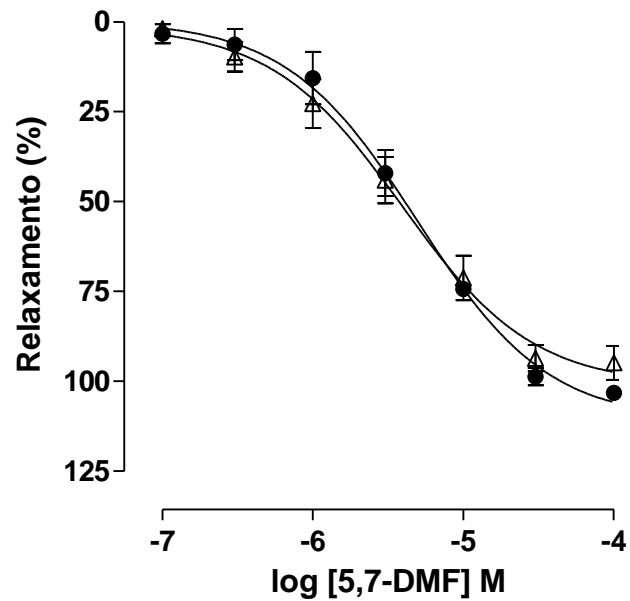
Figura 9 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta isolada de rato pré-contráida com 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de $10 \mu\text{M}$ de atropina (B).



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas da 5,7-DMF (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M) adicionadas às cubas. FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem, 5,7-DMF = 5,7-dimetoxiflavona.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 4 – Efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (●) e na presença de 10 μ M de atropina (Δ) em anéis de aorta isolados de rato com endotélio funcional.



Os símbolos representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

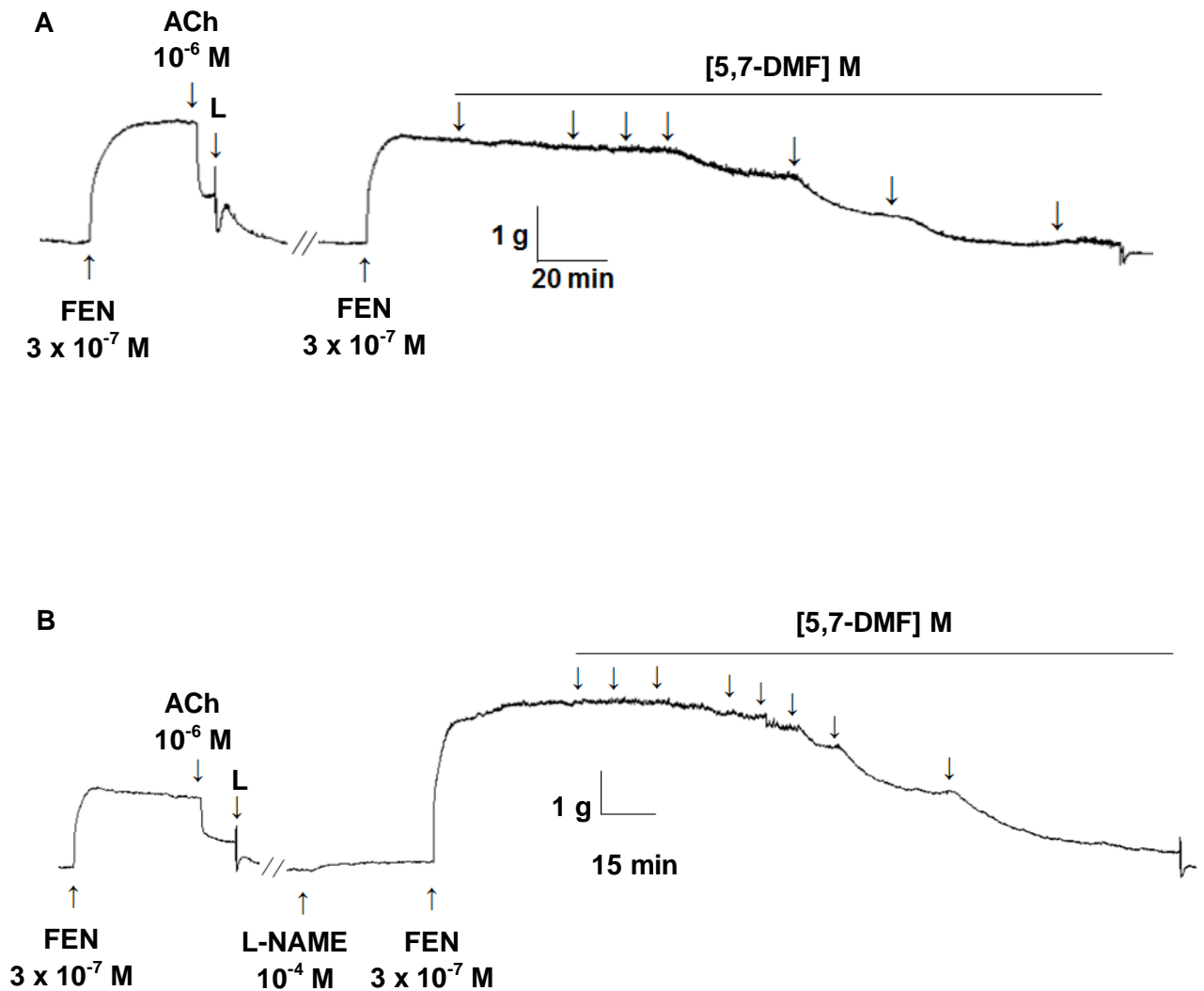
Fonte: Autor, 2018.

4.2.2 Confirmação do envolvimento do NO no efeito vasorrelaxante produzido pela 5,7-dimetoxiflavona em aorta isolada de rato

4.2.2.1 Efeito da 5,7-dimetoxiflavona sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na ausência e na presença de L-NAME e de L-arginina

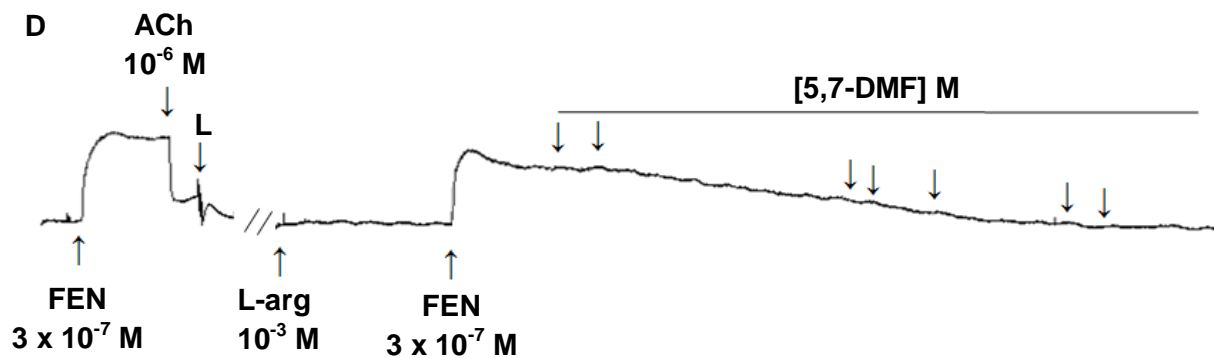
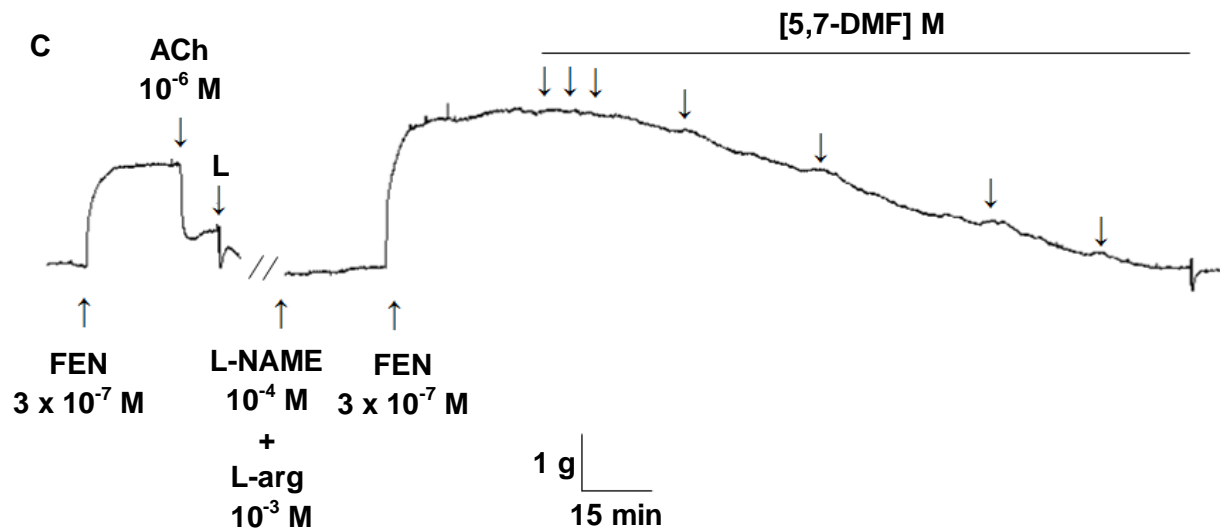
A curva controle de relaxamento da 5,7-DMF ($E_{\max} = 103,2 \pm 1,9\%$ e $CE_{50} = 4,5 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ M) foi desviada para a direita com redução da potência relaxante em cerca de 4,5 vezes na presença do L-NAME ($E_{\max} = 95,2 \pm 4,3\%$ e $CE_{50} = 2,0 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M). Este efeito inibitório do L-NAME foi revertido na presença de elevada concentração de L-arginina ($E_{\max} = 99,9 \pm 2,2\%$ e $CE_{50} = 3,4 \pm 0,8 \times 10^{-6}$ M). Diferentemente, na presença apenas da L-arginina, a curva foi desviada para a esquerda, com aumento da potência relaxante do flavonoide em cerca de 2 vezes ($E_{\max} = 108,6 \pm 4,5\%$ e $CE_{50} = 2,3 \pm 0,5 \times 10^{-6}$ M) (Figura 10 e Gráfico 5).

Figura 10 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta isolada de rato pré-contráida com 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 10^{-4} M de L-NAME (B) ou de 10^{-4} M de L-NAME + 10^{-3} M de L-arginina (C) ou 10^{-3} M de L-arginina (D) em anéis de aorta isolados de rato com endotélio funcional.



(Continua)

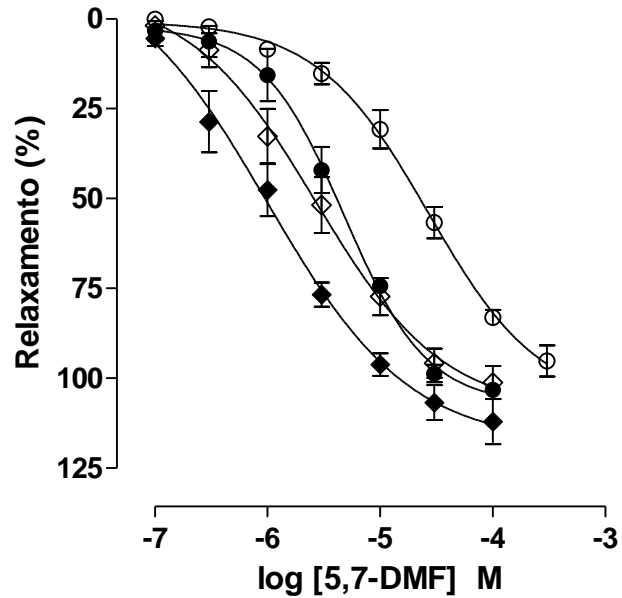
(Continuação)



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas da 5,7-DMF (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} ou 3×10^{-4} M) adicionadas às cubas. FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem, L-arg = L-arginina, 5,7-DMF = 5,7-dimetoxiflavona.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 5 – Efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (●) e na presença de 10^{-4} M de L-NAME (○) ou 10^{-4} M de L-NAME + 10^{-3} M de L-arginina (◇) ou 10^{-3} M de L-arginina (◆) em anéis de aorta isolados de rato com endotélio funcional.



Os símbolos representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Autor, 2018.

Tabela 2 – Valores de E_{\max} e CE_{50} da 5,7-DMF em anéis de aorta isolados de rato pré-contraída com FEN, na ausência e na presença dos inibidores.

Inibidores	E_{\max} (%)	CE_{50} (M)
Ausência (E+)	103,2 ± 1,9	4,5 ± 0,7 x 10 ⁻⁶
Ausência (E-)	101,5 ± 9,2	1,7 ± 0,3 x 10 ⁻⁵ #
Atropina	97,1 ± 2,7	3,8 ± 0,7 x 10 ⁻⁶
L-NAME	95,2 ± 4,3	2,0 ± 0,3 x 10 ⁻⁵ *
L-NAME + L-arg	99,9 ± 2,2	3,4 ± 0,8 x 10 ⁻⁶
L-arg	108,6 ± 4,5	2,3 ± 0,5 x 10 ⁻⁶ *

ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (Ausência (E+) vs. L-NAME/L-arg); # $p < 0,05$ (E+ vs. E-), n = 5.

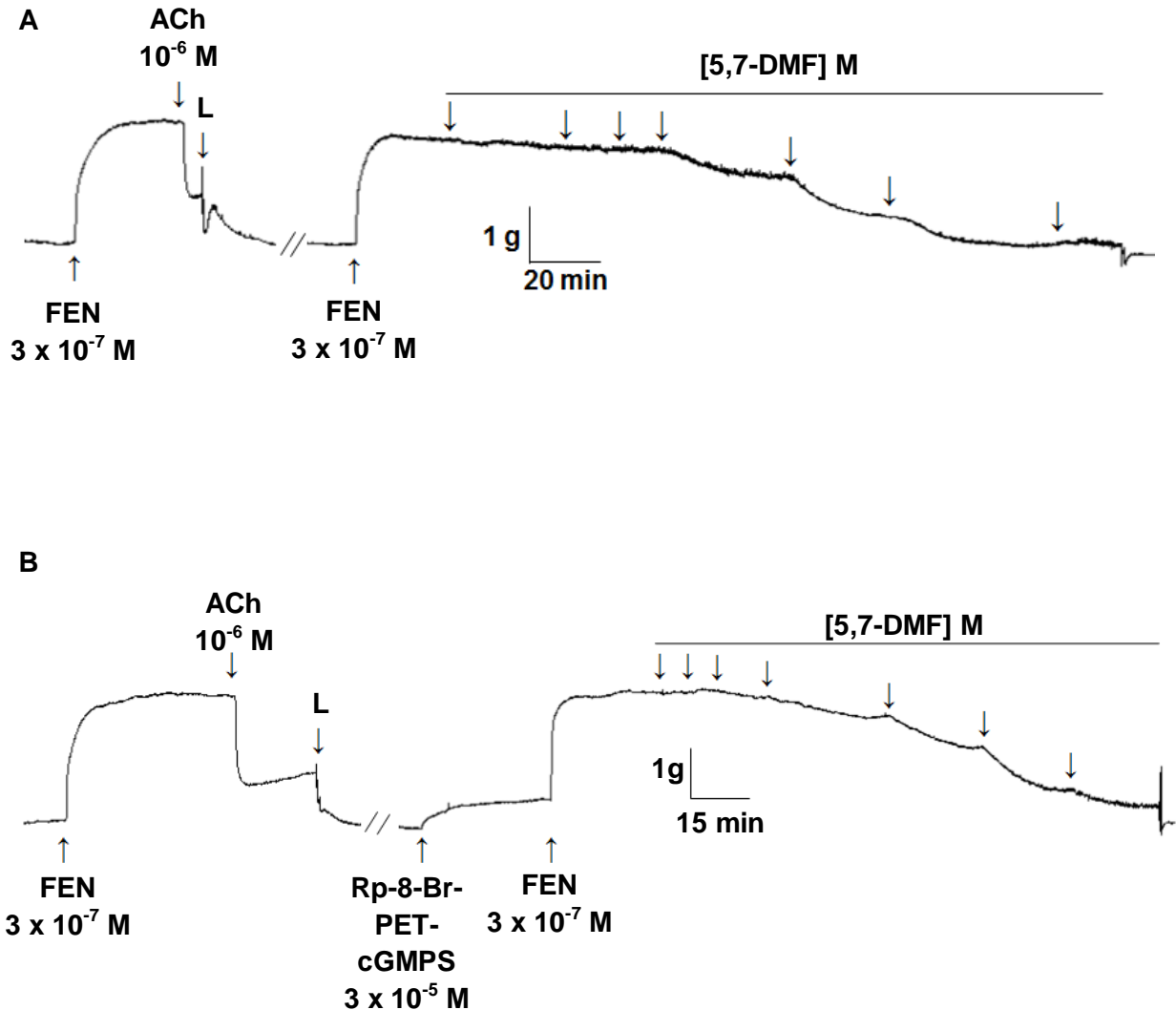
Fonte: Autor, 2018.

4.2.3 Avaliação da participação da proteína cinase dependente de cGMP (PKG) na ação relaxante da 5,7-DMF

4.2.3.1 Efeito da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por FEN na presença e na ausência de Rp-8-Br-PET-cGMPS

A curva de relaxamento da 5,7-DMF ($E_{\max} = 103,2 \pm 1,9\%$ e $CE_{50} = 4,5 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ M) foi desviada para a direita na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS, com redução da potência relaxante em cerca de 2 vezes e aumentando eficácia ($E_{\max} = 116,5 \pm 6,1\%$ e $CE_{50} = 8,3 \pm 1,7 \times 10^{-6}$ M) na presença do bloqueador (Figura 11 e Gráfico 6).

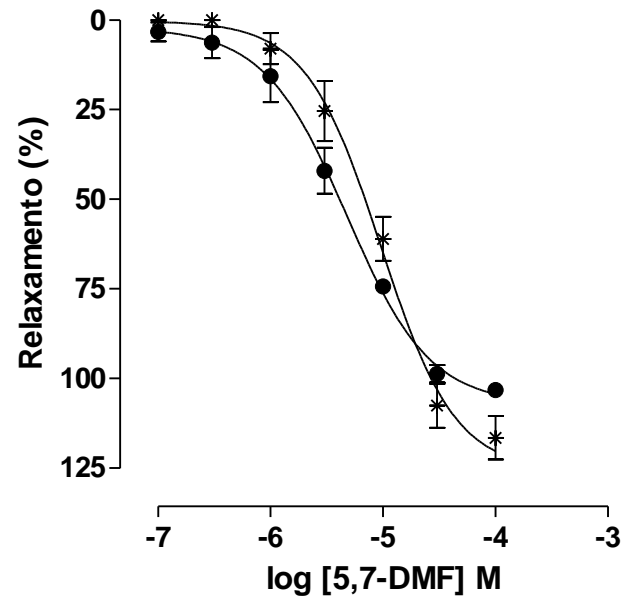
Figura 11 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta isolada de rato com endotélio funcional pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 3×10^{-5} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS (B).



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas da 5,7-DMF (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M) adicionadas às cubas. FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem, Rp-8-Br-PET-cGMPS = Rp-8-Bromo- β -fenil-1,N²-etenoguanosina-3', 5'- monofosforotiotato cíclico, 5,7-DMF = 5,7-dimetoxiflavona.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 6 – Efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (●) e na presença de 3×10^{-5} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS (*) em anéis de aorta isolados de rato com endotélio funcional.



Os símbolos representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

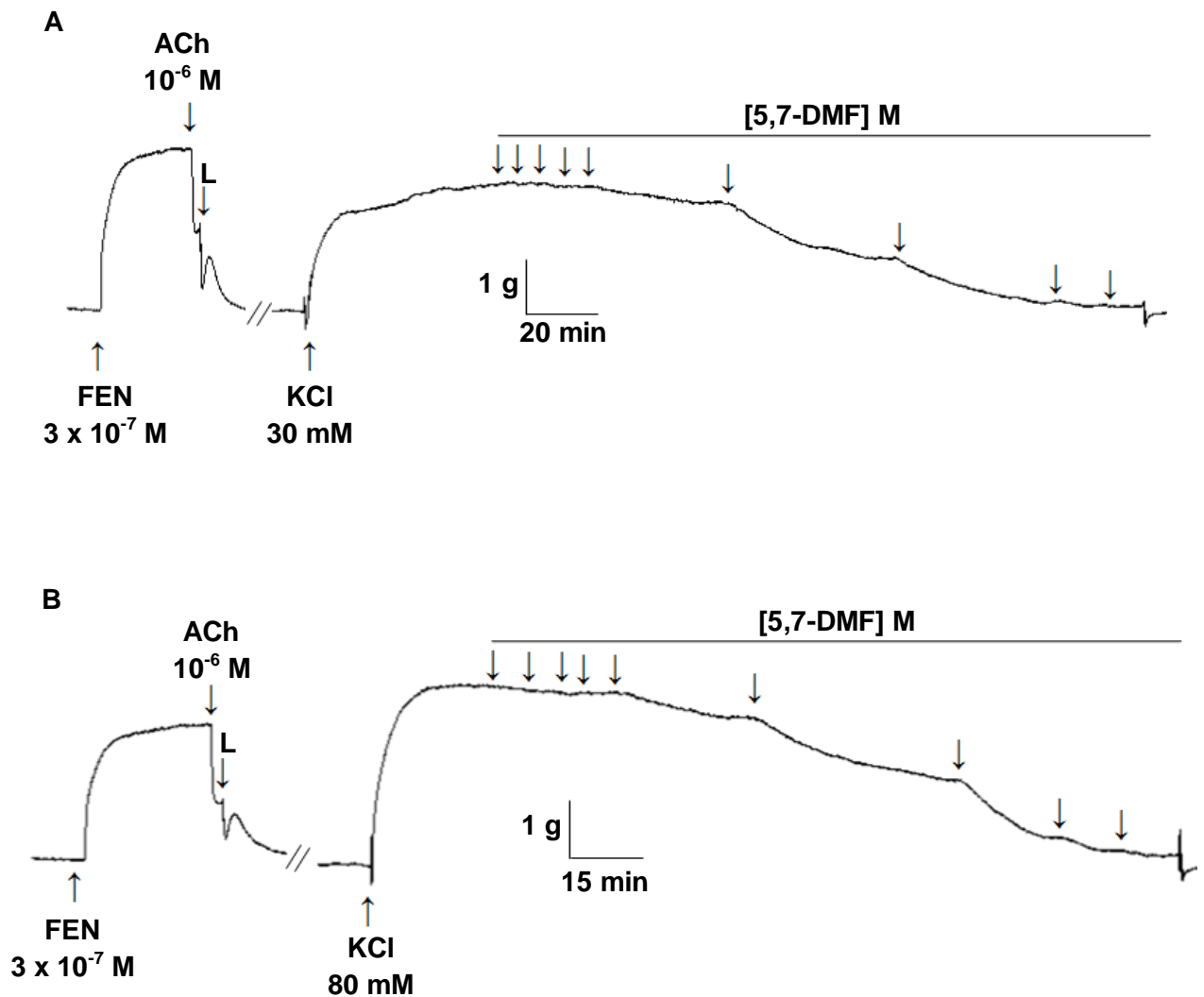
Fonte: Autor, 2018.

4.2.4 Avaliação da participação dos canais de potássio ou de cálcio dependente de voltagem no efeito vasorrelaxante produzido pela 5,7-DMF

4.2.4.1 Efeito da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou 80 mM de KCl

A 5,7-DMF adicionada cumulativamente à cuba, relaxou de maneira dependente de concentração e equipotente os anéis de aorta quando estes eram pré-contraídos com moderada (30 mM) concentração de KCl ($E_{\max} = 94,6 \pm 1,4\%$ e $CE_{50} = 1,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) ou alta concentração (80 mM) de KCl ($E_{\max} = 98,8 \pm 2,8\%$ e $CE_{50} = 2,2 \pm 0,2 \times 10^{-5}$ M) (Figura 12 e Gráfico 7).

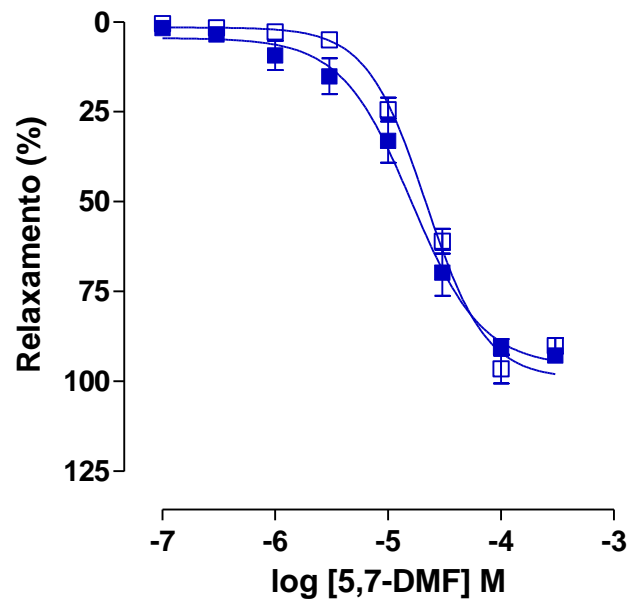
Figura 12 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta isolada de rato com endotélio funcional pré-contraída com 30 mM (A) ou 80 mM de KCl (B).



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas da 5,7-DMF (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M) adicionadas às cubas. FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem, KCl = cloreto de potássio, 5,7-DMF = 5,7-dimetoxiflavona.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 7 – Efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 30 mM (■) e 80 mM de KCl (□) em anéis de aorta isolados de rato com endotélio funcional.



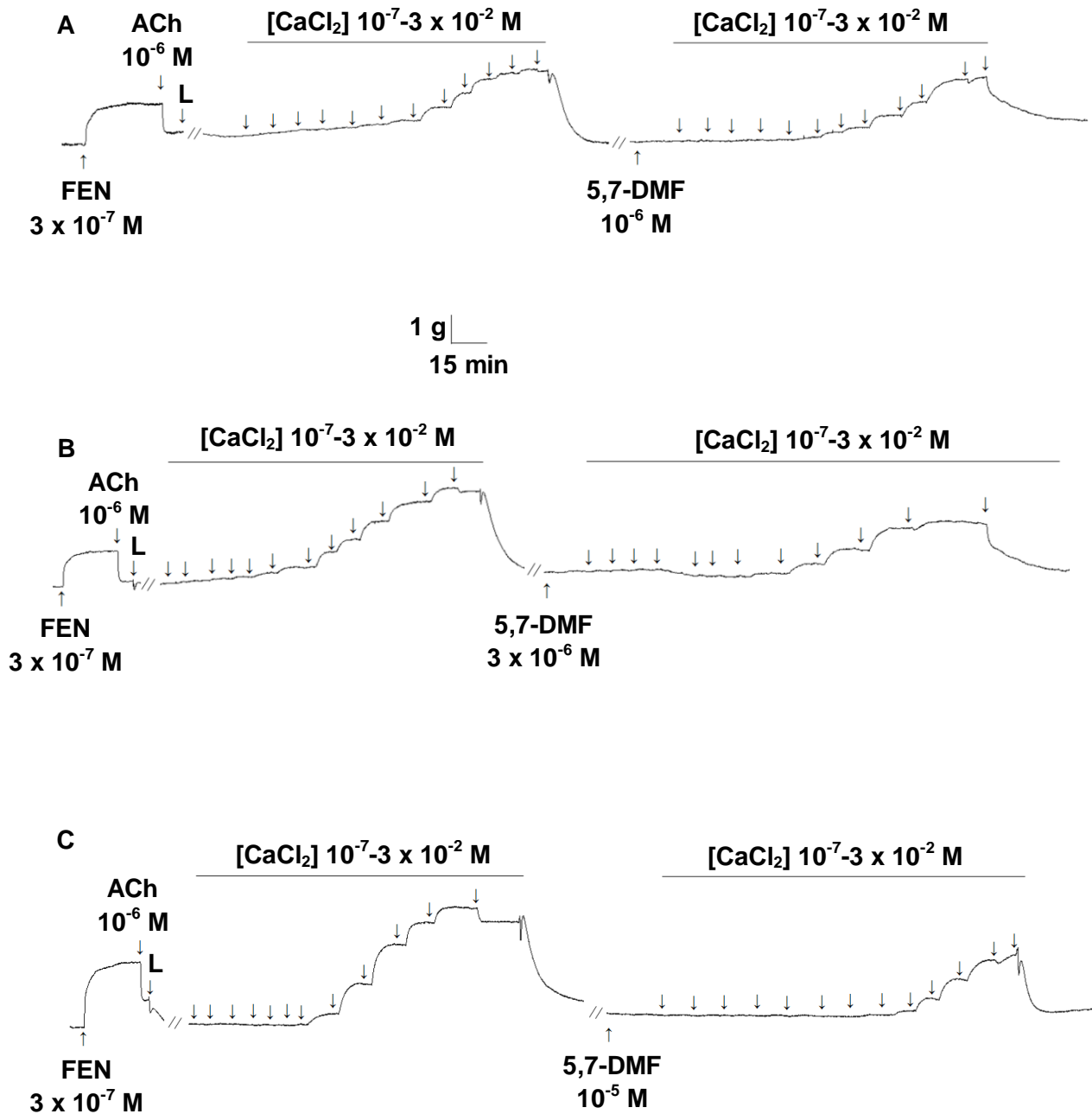
Os símbolos representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Autor, 2018.

4.2.4.2 Efeito da 5,7-DMF frente às contrações cumulativas induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+}

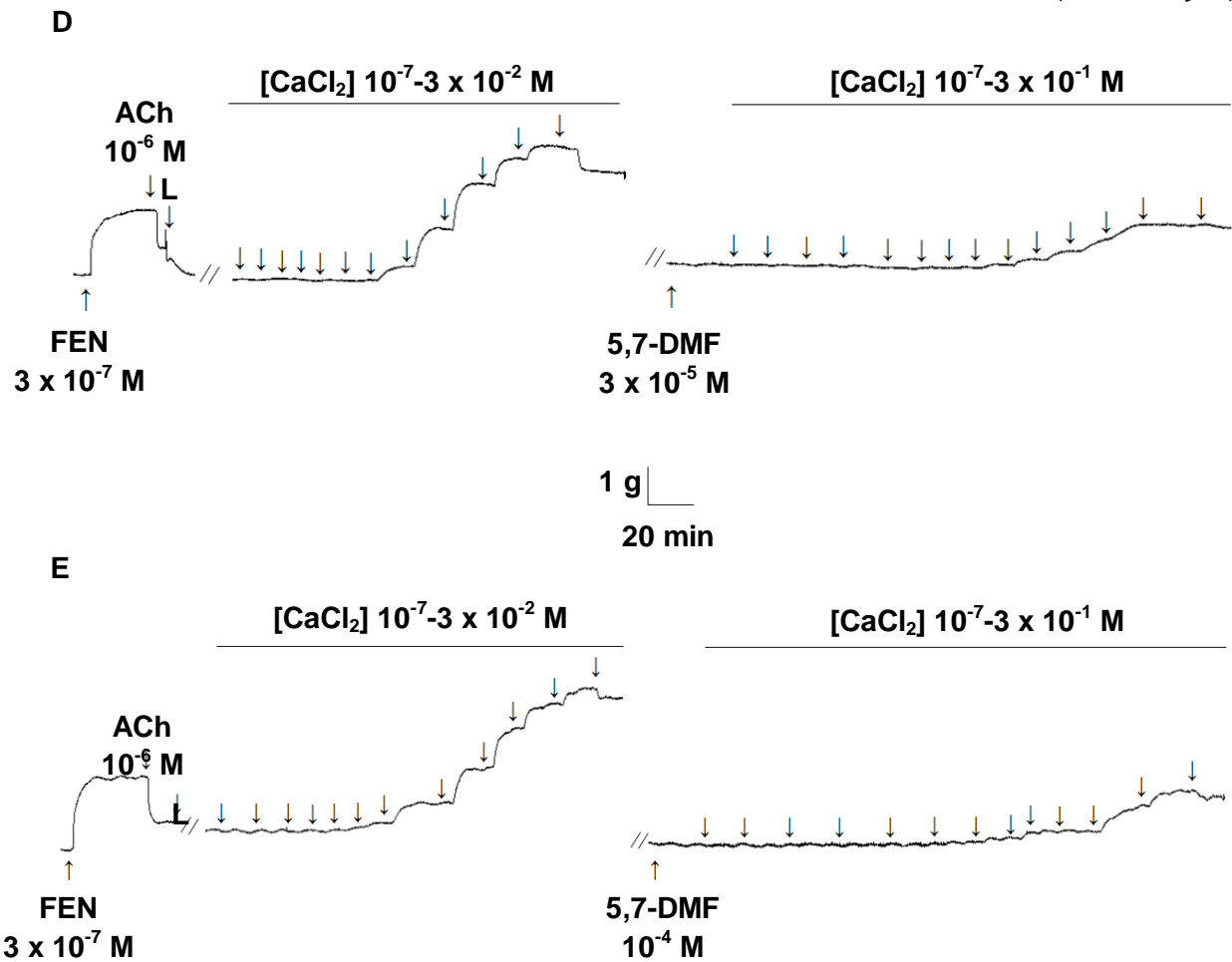
A 5,7-DMF (10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M) inibiu de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 80 mM) nominalmente sem Ca^{2+} . As curvas cumulativas ao CaCl_2 foram desviadas para a direita de maneira não paralela e com redução do E_{max} de 100% (controle) para $87,2 \pm 4,3$; $61,3 \pm 2,3$; $47,7 \pm 3,5$; $30,9 \pm 1,7$ e $34,8 \pm 2,2\%$ respectivamente ($n = 5$). Os valores de CE_{50} do CaCl_2 passaram de $1,8 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ M no controle, para $6,0 \pm 2,4 \times 10^{-4}$; $1,7 \pm 0,6 \times 10^{-4}$; $3,5 \pm 1,3 \times 10^{-3}$ e $3,5 \pm 1,3 \times 10^{-3}$ M, respectivamente (Figura 13 e Gráfico 8).

Figura 13 – Registros originais representativos das curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 na presença da 5,7-DMF nas concentrações de 10^{-6} (A), 3×10^{-6} (B), 10^{-5} (C), 3×10^{-5} (D) e 10^{-4} (E) em anéis de aorta isolados de rato com endotélio funcional.



(Continua)

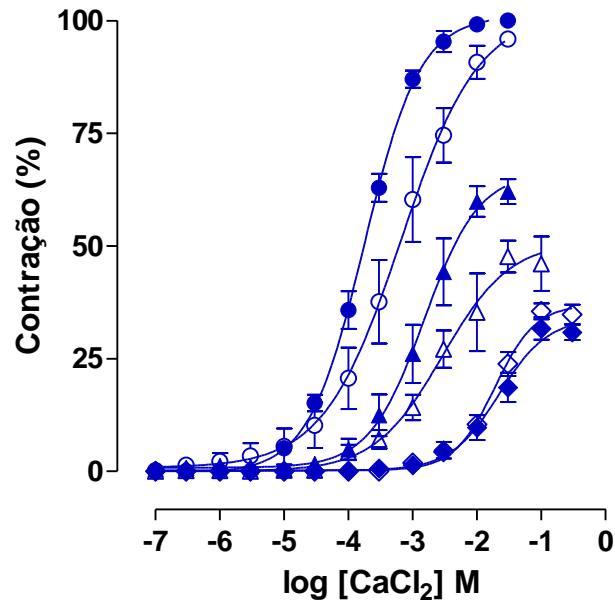
(Continuação)



As setas para baixo representam a adição cumulativa de CaCl₂ (10⁻⁷-3 x 10⁻¹ M) adicionadas às cubas. FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem, CaCl₂ = cloreto de cálcio, 5,7-DMF = 5,7-dimetoxiflavona.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 8 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (●) e na presença da 5,7-DMF nas concentrações 10^{-6} (○), 3×10^{-6} (▲), 10^{-5} (△), 3×10^{-5} (◆) e 10^{-4} M (◇) em anéis de aorta isolado de rato com endotélio funcional.



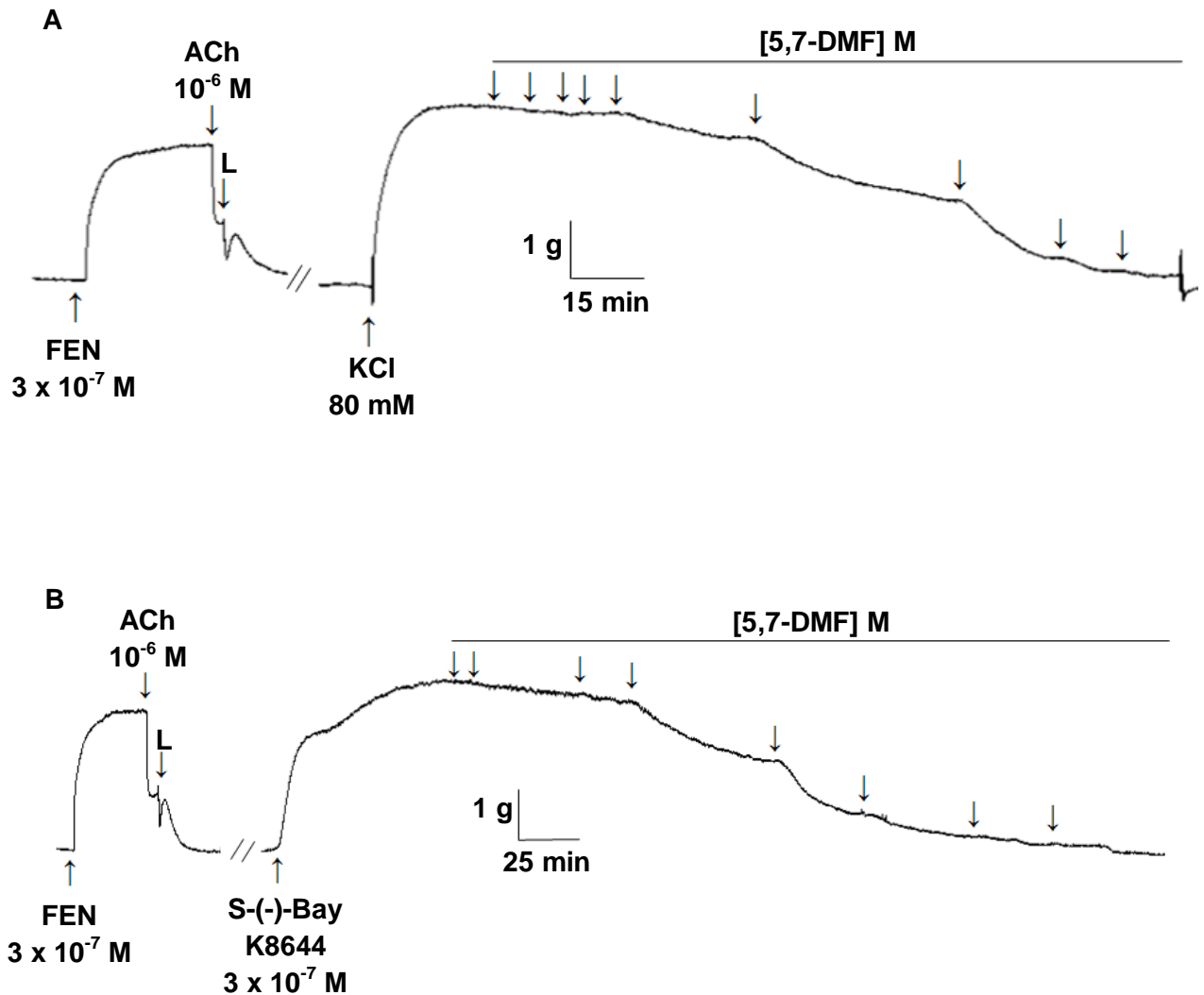
Os símbolos representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Autor, 2018.

4.2.4.3 Efeito da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644

O flavonoide 5,7-DMF relaxou de maneira dependente de concentração a aorta isolada de rato pré-contráida com S-(-)-Bay K8644 ($E_{\max} = 100,5 \pm 2,2\%$ e $CE_{50} = 3,5 \pm 0,7 \times 10^{-6} \text{ M}$), com aumento da potência em torno de 6 vezes em relação a curva de relaxamento da 5,7-DMF na presença de altas concentrações (80 mM) de KCl ($E_{\max} = 98,8 \pm 2,8\%$ e $CE_{50} = 2,2 \pm 0,2 \times 10^{-5} \text{ M}$) (Figura 14 e Gráfico 9).

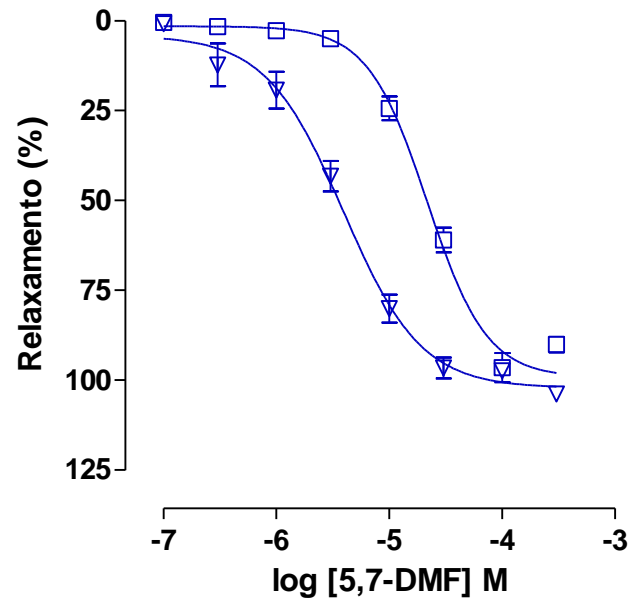
Figura 14 – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta isolada de rato com endotélio funcional pré-contraída com 80 mM de KCl (**A**) ou com 3×10^{-7} M de S-(-) Bay K8644 (**B**).



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas da 5,7-DMF (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M) adicionadas às cubas. FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem, S-(-)-Bay K8644 = 1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-trifluorometil]fenil]3-piridina carboxílico ácido metil éster, 5-7-DMF = 5,7 dimetoxiflavona.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 9 – Efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF sobre as contrações tônicas induzidas por 80 mM de KCl (\square) ou S-(-)-Bay K8644 (∇) em anéis de aorta isolados de rato com endotélio funcional.



Os símbolos representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Autor, 2018.

5 Discussão

Diante do fato de que o extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* (ZB-EtOH_{PA}), solubilizado com Cremophor[®], apresentou atividade espasmolítica em diversos modelos de músculo liso, resolveu-se investigar se o flavonoide isolado desta espécie, a 5,7-dimetoxiflavona (5,7-DMF) e solubilizada com Cremophor[®], também apresentaria este efeito. Dessa forma, realizou-se uma triagem farmacológica em músculos lisos, fásico e tônico, e pode-se observar uma atividade espasmolítica não seletiva para o flavonoide nestes órgãos testados. Dentre os órgãos testados, o flavonoide apresentou maior potência sobre a aorta de rato, sendo esta, já relatada para a 5,7-DMF, isolada dos rizomas da espécie *Kaempferia parviflora* e solubilizada com dimetilsulfóxido – DMSO (TEP-AREENAN; SAWASDEE; RANDALL, 2010). Sendo assim, decidiu-se continuar avaliando o mecanismo de ação proposto para o mesmo.

O músculo liso é o principal tipo de músculo que controla a maioria dos sistemas de órgãos ocos do corpo (WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005), como trato gastrointestinal, vias respiratórias e vasos sanguíneos, tornando-o, assim, um tecido fundamental para homeostasia do organismo (WEBB, 2003). Dessa forma, uma desregulação no processo de contração e relaxamento pode ocasionar enfermidades como constipação e diarreia, asma e hipertensão (KIM et al., 2008). As substâncias com atividade espasmolíticas são úteis no tratamento dessas doenças, porém devido aos efeitos colaterais, ainda se faz necessário a busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento das mesmas.

Os produtos naturais, obtidos principalmente de plantas, são fontes promissoras de descoberta de novas moléculas bioativas. Neste contexto, se destacam os flavonoides, que apresentam atividades biológicas diversas, em destaque atividade sobre diferentes músculos lisos, como útero de rata (LIMA, 2008; MACÊDO et al., 2011; LIU et al., 2018; FERREIRA, 2018), corpo cavernoso (HNATYSZYN et al., 2004), íleo (SANTOS, 2007; LIMA, 2008; MACÊDO et al., 2011) e traqueia de cobaia (MACÊDO et al., 2011; YANG et al., 2013) e aorta de rato (SILVA, 2005; MACÊDO et al., 2011; CHEN; KO, 2017).

O músculo liso intestinal é um meio importante para se investigar mecanismos de ação de substâncias que possam ser utilizadas em processos fisiopatológicos como cólicas intestinais e diarreia (KIM et al., 2008). A cólica intestinal é comumente causada por fortes contrações da musculatura lisa, por meio da ação do sistema nervoso entérico. Clinicamente, a dor causada pelos espasmos gastrointestinais é

geralmente tratada com drogas que induzem relaxamento dessa musculatura lisa (SATO et al., 2007). Já a diarreia, considerada um problema mundial de saúde pública por atingir em escala global cerca de 1,7 bilhão de pessoas por ano (WHO, 2017a), pode estar associada a várias etiologias como vírus, bactérias, parasitas, intoxicação alimentar ou medicamentos (ESTRADA-SOTO et al., 2007). Entretanto, ela muitas vezes apresenta-se como um sinal do aumento da motilidade intestinal e/ou aumento da secreção da mucosa gastrintestinal em resposta a diversos estímulos (FIELD; SEMRAD, 1993).

Dessa forma, substâncias espasmolíticas podem ser úteis para o tratamento da diarreia ou de cólicas intestinais, visto que estes reduzem a motilidade e a secreção por impedir a ligação do neurotransmissor acetilcolina em seu receptor muscarínico, presente no músculo liso intestinal (LEE, 2015). Alguns exemplos de agentes antidiarreicos desta classe são: o extrato fluido de beladona (Elixir Paregórico®), a tintura de ópio, a atropina (Atropion®), a escopolamina (Buscopan®), a papaverina, a diciclomina (Bentyl®), dentre outros (BROWN; TAYLOR, 2012).

Diante do fato de que o ZB-EtOH_{PA} apresentou efeito espasmolítico em íleo de cobaia (OLIVEIRA et al., 2016a), resolveu-se investigar se a 5,7-DMF, isolada deste extrato, também apresentaria tal efeito. Dessa forma, observou-se que este flavonoide apresenta atividade espasmolítica em íleo de cobaia, uma vez que o mesmo antagonizou as contrações fásicas induzidas tanto por CCh ($CI_{50} = 3,2 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M) quanto por histamina ($CI_{50} = 9,9 \pm 1,4 \times 10^{-6}$ M), apresentando maior potência quando as contrações eram induzidas por histamina (Gráfico 1), indicando uma provável participação do receptor histaminérgico no mecanismo de ação do flavonoide neste modelo de músculo liso. Além disso, como o ZB-EtOH_{PA} apresentou equipotência em inibir as contrações fásicas induzidas por carbacol e histamina (OLIVEIRA et al., 2016a), sugere-se que essa atividade ocorre provavelmente pela presença de outras substâncias.

Outros flavonoides também apresentaram efeito sobre íleo de cobaia como quercetina (CAPASSO et al., 1991), naringenina, apigenina, genisteína (GHARZOULI; HOLZER, 2004), catequina (GHAYUR; KHAN; GILANI, 2007), retusina, me-retusina (SANTOS, 2007) e diplotropina (LIMA, 2008). A literatura também relata alguns flavonoides com atividade espasmolítica sobre íleo de rato, como galangina, quercetina, crisina, naringenina (HAMMAD; ABDALLA, 1997) e cirsiolol (MUSTAFA et al., 1992).

Envolvendo a musculatura lisa das vias aéreas, a asma é uma doença que acomete grande parcela da população mundial, principalmente em países industrializados (BRAMAN, 2006; AKINBAMI et al., 2009). Dessa forma, inúmeras pesquisas para elucidar os mecanismos subjacentes da fisiopatologia da asma e, conseqüentemente, identificar novas alternativas terapêuticas no tratamento deste distúrbio vêm sendo realizadas, visto que as drogas empregadas na terapêutica geralmente vêm acompanhadas de efeitos secundários indesejados ou de baixa seletividade para os seus alvos (JANSSEN, 2009; SIDDIQUI et al., 2013; DOWELL et al., 2014). Sendo assim, a avaliação do efeito relaxante das vias aéreas utilizando traqueia de cobaia é uma ferramenta de grande valia na busca por novas moléculas.

Sabendo que o ZB-EtOH_{PA} também apresentou efeito relaxante em traqueia de cobaia (OLIVEIRA et al., 2016a), resolveu-se investigar se a 5,7-DMF também apresentaria tal efeito. Diante dos resultados, pode-se observar que a 5,7-DMF relaxou de maneira equipotente e dependente de concentração tanto na presença ($CE_{50} = 2,4 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M) quanto na ausência ($CE_{50} = 2,6 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M) de epitélio funcional (Gráfico 2), descartando a participação dos fatores relaxantes derivados do epitélio no mecanismo de ação relaxante da 5,7-DMF em traqueia isolada de cobaia. De maneira similar, o extrato etanólico também apresentou equipotência em relaxar a traqueia isolada de cobaia na presença e ausência de epitélio funcional (OLIVEIRA et al., 2016a), sugerindo então que o efeito promovido pelo extrato em traqueia de cobaia parece ser devido a presença do flavonoide.

Resultados semelhantes foram observados com outros flavonoides como hispidulina (ABDALLA, 1988), isoorientina (AFIFI; KHALIL; ABDALLA, 1998), catequina (GHAYUR; KHAN; GILANI, 2007), isoliquiritigenin (LIU et al., 2008), 3,6-dimetil-éster galeína (MACÊDO et al., 2011), apigenina (CHEN; KO, 2017). Diferentemente, outros flavonoides como a isokaempferida apresentou atividade relaxante através dos fatores relaxantes derivados do epitélio (LEAL et al., 2006).

O sistema cardiovascular também tem sido alvo de interesse em diversas pesquisas (SHAKERI et al., 2011). Trata-se de um dos sistemas mais importantes do organismo e uma desregulação neste sistema está associada a uma série de doenças, muitas delas de alta prevalência como a insuficiência cardíaca congestiva, aterosclerose e hipertensão (KOLANKIEWICZ; GIOVELLI, 2008; ANDRADE et al., 2015; REIS et al., 2016).

Tendo-se em vista que o aumento do tônus vascular pode ter repercussões graves no organismo, como o surgimento de hipertensão arterial, substâncias que venham a regular o tônus basal ou que relaxem a musculatura lisa dos vasos seriam fármacos com potencial utilização terapêutica.

Oliveira et al. (2016a) demonstraram que o ZB-EtOH_{PA}, dissolvido em Cremophor[®], apresentou efeito vasorrelaxante em aorta de rato. Além disso, Tep-areenan, Sawasdee e Randall (2010) descreveram o efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta de rato, dissolvida em dimetilsufóxido (DMSO) e administrada sobre a contração tônica induzida por metoxamina, um agonista dos receptores α_1 (FLAVAHAN; VANHOUTTE, 1986). Entretanto, alguns estudos reconhecem uma provável toxicidade para o DMSO, que é um solvente aprótico importante, que pode solubilizar uma grande variedade de moléculas polares e não polares, além disso é relatado que este solvente pode causar apoptose no tecido linfóide (CHATEAU et al., 1996; TRUBIANI et al., 1996; AITA et al., 2005), e no sistema nervoso central de camundongos por ativação da caspase-3 (HANSLICK et al., 2009) ou inibição dos receptores NMDA (N-metil D-aspartato) (LU; MATTSON, 2011).

Para outros fármacos, como o paclitaxel, em experimentos *in vivo*, foi relatado que este se apresenta menos efetivo contra células tumorais quando dissolvido em DMSO, ao contrário do que foi observado quando este fármaco era dissolvido em Cremophor[®]. Já em experimentos *in vitro*, para ambos os agentes solubilizantes, não há diferença no efeito do paclitaxel (HAIT, 2012). Além disso, Galvão et al. (2013) recomendam o DMSO não seja empregado para solubilizar substâncias. Em contrapartida, Ribeiro (2007) relatou que em aorta de rato, não houve diferença no efeito vasorrelaxante do labdano-302, solubilizado com DMSO ou com Cremophor[®].

Além de contrapor-se em relação ao agente solubilizante, no trabalho realizado por Tep-areenan, Sawasdee e Randall (2010), as contrações eram induzidas por metoxamina, um agonista dos receptores α_1 , o qual possui uma constante de afinidade menor ($pK = 4,5$) quando comparado a da fenilefrina ($pK = 5,9$) (MINNEMAN et al., 1994). Entretanto, os autores utilizaram maiores concentrações de metoxamina (10^{-7} - 10^{-4} M) em comparação à concentração utilizada de fenilefrina no presente trabalho (3×10^{-7} M), para obtenção do mesmo padrão de curvas.

Dessa forma, levantou-se a hipótese de que o efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF poderia ser potencializado quando este era solubilizado em Cremophor® e utilizado sobre o componente tônico da contração induzida por fenilefrina.

A 5,7-DMF, dissolvida em Cremophor®, apresentou efeito vasorrelaxante dependente de concentração tanto na presença ($CE_{50} = 4,5 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ M) quanto na ausência ($CE_{50} = 1,7 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) de endotélio funcional (Gráfico 3). A hipótese anterior foi confirmada pela observação de que a 5,7-DMF se mostrou mais potente quando era solubilizada com o Cremophor®, em relação ao observado quando esta era solubilizada com o DMSO, que apresentou uma CE_{50} em torno de 10^{-5} M na presença de endotélio funcional (TEP-AREENAN; SAWASDEE; RANDALL, 2010).

Ao analisar-se os valores de CE_{50} da 5,7-DMF, pode-se observar uma potência cerca de 4 vezes maior quando os anéis estavam íntegros comparada aos anéis sem endotélio funcional, indicando que o efeito vasorrelaxante deste flavonoide ocorre através da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio. Esses resultados sugerem que a atividade apresentada pelo ZB-EtOH_{PA}, ocorre provavelmente pela presença de outras substâncias, uma vez que o mesmo apresentou equipotência em relaxar a aorta de rato tanto na presença como na ausência de endotélio funcional (OLIVEIRA et al., 2016a).

No endotélio vascular há liberação de vasodilatadores como o NO, o EDHF e a PGI₂, sendo esta última, considerada o prostanoide vasodilatador mais importante produzido pelas células endoteliais (CARVALHO et al., 2001). Em contrapartida, no músculo liso das vias aéreas, a PGI₂ liberada pelo epitélio, não possui efeito pronunciado (BREYER; HAO; QI, 2001), além de que outros mediadores têm papel importante na homeostase das vias aéreas, como a prostaglandina D₂ (PGD₂), formada a partir do metabolismo do AA, considerada uma forte broncoconstritora (JOHNSTON et al., 1995). Dessa forma, de maneira diferente, em traqueia isolada de cobaia foi observada uma equipotência no efeito relaxante do flavonoide na presença e na ausência de epitélio funcional, sugerindo que no epitélio há a prevalência de outros fatores relaxantes (Gráfico 2).

De maneira semelhante, diversos outros flavonoides também apresentaram efeito vasorrelaxante em aorta de rato, como quercetina (FITZPATRICK; HIRSCHFIELD; COFFEY, 1993), rutina, crisina (AJAY; GILANI, MUSTAFA, 2003), 3,7,8,4'-tetra-O-metilgossipetina, 3,7-di-O-metilcanferol (SILVA, 2005), galangina (MORELLO et al., 2006), 4',5,7-triidroxi-3,6-dimetoxiflavona (FGAL) (MACÊDO et al.,

2011), entre outros. Alguns, também de maneira dependente de endotélio (FITZPATRICK; HIRSCHFIELD; COFFEY, 1993; MISHRA et al., 2000; GUERRERO et al., 2002; AJAY; GILANI, MUSTAFA, 2003; ALMEIDA-REZENDE et al., 2016).

Portanto, na triagem farmacológica preliminar, foi observado que a 5,7-DMF apresenta uma atividade espasmolítica não seletiva em íleo e traqueia isolados de cobaia e em aorta de rato, mostrando uma maior potência relaxante neste último órgão. Sendo assim, resolveu-se continuar com o estudo do mecanismo de ação vasorrelaxante da 5,7-DMF, solubilizada em Cremophor[®], em aorta de rato.

Dessa forma, sabendo-se que a ativação dos receptores muscarínicos endoteliais é uma das principais formas de produção e liberação de NO nos vasos sanguíneos (MONCADA et al., 1991; BRUNNING et al., 1994; GUEDES et al., 2004) e que a 5,7-DMF parece exercer seu efeito vasorrelaxante através dos fatores relaxantes derivados do endotélio em aorta de rato (TEP-AREENAN; SAWASDEE; RANDALL, 2010), resolveu-se investigar a participação desse receptor no efeito vasorrelaxante do flavonoide.

Diante dos resultados obtidos, pode-se observar que na presença da atropina, a curva controle de relaxamento do flavonoide ($CE_{50} = 4,5 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ M) não foi desviada ($CE_{50} = 3,8 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ M, Gráfico 4), sugerindo que provavelmente a via muscarínica não está envolvida no mecanismo de ação vasorrelaxante produzido pela 5,7-DMF. De maneira semelhante, os flavonoides diocleina (LEMOS et al., 1999), scutellarina (PAN et al., 2008), tilianina (HERNÁNDEZ-ABREU et al., 2009) e ayanina (CARRÓN et al., 2010) também exibiram tal efeito.

Após ser produzido no endotélio, o NO atravessa este espaço migrando até a célula muscular lisa vascular, onde vai se ligar a ciclase de guanilil solúvel (sCG) e esta vai clivar e ciclar o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanonisa (cGMP), que irá ativar a cinase dependente de cGMP (PKG) estimulando-a a fosforilar os alvos semelhantes aos da PKA, anteriormente citados (Figura 6) (TRAN; OHASHI; WATANABE, 2000; CHANG et al., 2010; JIN et al., 2011; KIM; LEE; RHYU, 2011).

Tep-Areenan, Sawasdee e Randall (2010) descreveram que o efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF isolada dos rizomas de *Kaempferia parviflora* foi atenuado na presença do L-NAME, um inibidor da NOS. Entretanto, visto que o efeito do flavonoide foi potencializado quando dissolvido com Cremophor[®], resolveu-se confirmar a participação da via do NO neste mecanismo de ação vasorrelaxante,

refazendo o protocolo experimental na presença do L-NAME, como também através da verificação da reversibilidade do efeito inibitório desta ferramenta farmacológica.

Dessa forma, observou-se que na presença do inibidor da NOS, a curva de relaxamento da 5,7-DMF foi deslocada para a direita (Gráfico 5), diminuindo a potência relaxante cerca de 4,5 vezes ($CE_{50} = 2,0 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) quando comparado a curva na ausência do inibidor ($CE_{50} = 4,5 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ M), semelhante ao que foi observado por Tep-Areenan, Sawasdee e Randall (2010).

A enzima eNOS possui como substrato para a produção de NO, a L-arginina, porém uma vez ocorrendo a ligação e inibição com o L-NAME, não passível de catálise, este passa a ser considerado um falso substrato, sendo deslocado da ligação com a eNOS. Desse modo, como uma contra-prova da participação da NOS no efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF, utilizou-se L-arginina em altas concentrações para verificar a reversibilidade do efeito inibidor do L-NAME, e diante dos resultados obtidos, pode-se observar que a curva de relaxamento do flavonoide, na presença do L-NAME, foi deslocada para esquerda na presença simultânea do L-NAME e L-arginina ($CE_{50} = 3,4 \pm 0,8 \times 10^{-6}$ M, Gráfico 5), sugerindo a reversibilidade do seu efeito inibidor no relaxamento produzido pela 5,7-DMF, uma vez que a L-arginina em altas concentrações vai competir e deslocar o L-NAME da ligação com a eNOS.

Para confirmar se a 5,7-DMF de fato estaria se ligando a eNOS uma segunda contraprova foi realizada, onde apenas a L-arginina foi pré-incubada. Como a oferta do substrato foi maior se esperava uma potencialização do efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF na presença da L-arginina sozinha. Dessa forma, foi observado uma potencialização do efeito do flavonoide, onde a curva de relaxamento da 5,7-DMF na presença de L-arginina foi deslocada para a esquerda, com potência maior cerca de duas vezes ($CE_{50} = 2,3 \pm 0,5 \times 10^{-6}$ M, Gráfico 5) em comparação a curva controle. Desta forma, esses dados demonstram que a 5,7-DMF atua ativando a eNOS para promover seu efeito vasorrelaxante em aorta de rato.

Outros flavonoides também já foram relatados por apresentarem efeito vasorrelaxante através da via do NO, demonstrando um efeito inibitório na presença do L-NAME em aorta de rato, como a diadzeína, fisetina, naringenina e quercetina (AJAY et al., 2003), galangina (MORELLO et al., 2006), catequina (GHAYUR; KHAN; GILANI, 2007) e formononetina (WU et al., 2010). Também há na literatura relatos de alguns extratos obtidos de espécies pertencentes à família Leguminosae que

apresentaram efeitos semelhantes, como *Albizia inopinata* (PIRES et al., 2000) e *Sophora flavescens* (JIN et al., 2011).

Outro fator relaxante derivado do endotélio é a prostaciclina (PGI_2), sendo considerada o prostanoide vasodilatador mais importante produzido pelas células endoteliais (TRAN; OHASHI; WATANABE, 2000). Os prostanoides pertencem a família dos eicosanoides e após a sua ativação e consequente aumento da concentração de ácido araquidônico, este é metabolizado pelas enzimas ciclo-oxigenases. Depois de formada, a PGI_2 exerce seu efeito relaxante se ligando ao receptor IP , o qual acopla a proteína Gs , ocasionando vasorrelaxamento através da via AC/cAMP/PKA (WOODWARD et al., 2011; HIRATA, NARUMIYA, 2011). Dessa forma, Tep-Areenan, Sawasdee e Randall (2010) descreveram que o mecanismo vasorrelaxante da 5,7-DMF isolada dos rizomas de *Kaempferia parviflora* envolve a via das ciclooxigenases, uma vez que o efeito deste flavonoide foi atenuado na presença da indometacina, um inibidor não seletivo da ciclooxigenase.

Sabe-se que a ciclase de guanilil solúvel (sCG) é uma enzima chave no processo de relaxamento mediado pelo NO (IGNARRO, 1990), e que a utilização de ativadores ou inibidores desta enzima foram essenciais para a descoberta da sua função (WEGENER; NAWRATH, 1997). Tep-Areenan, Sawasdee e Randall (2010) descreveram a participação da sCG no mecanismo de ação vasorrelaxante produzido pela 5,7-DMF em aorta de rato, uma vez que na presença de um inibidor desta enzima, o ODQ, o efeito relaxante do flavonoide foi atenuado.

Sabendo-se que o cGMP formado a partir da ativação da sCG ativará a PKG, esta fosforilará alvos importantes para o relaxamento do músculo liso vascular, através da ativação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), da PMCA e da SERCA, dos canais de K^+ , do bloqueio direto dos Ca_v e do receptor de IP_3 , além da inibição da MLCK. Todos estes passos irão culminar no relaxamento muscular (TRAN; OHASHI; WATANABE, 2000; CHANG et al., 2010; JIN et al., 2011; KIM; LEE; RHYU, 2011; BONAVENTURA et al., 2011).

Entretanto, Tep-Areenan, Sawasdee e Randall (2010) não investigaram o próximo passo na via de sinalização *downstream* do NO, sendo assim, resolveu-se avaliar se a PKG também estaria envolvida no efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF. Para isto, foi utilizado o Rp-8-Br-PET-cGMPS, um inibidor seletivo da PKG (IBARRA-ALVORADO et al., 2002) e pode-se observar que a curva controle ($\text{CE}_{50} = 4,5 \pm 0,7 \times 10^{-6} \text{ M}$; $\text{E}_{\text{max}} = 103,2 \pm 1,9\%$) foi deslocada para direita na

presença do inibidor ($CE_{50} = 8,3 \pm 1,7 \times 10^{-6}$ M, Gráfico 6), reduzindo em cerca de 2,5 vezes sua potência relaxante, com aumento da eficácia de $103,2 \pm 1,9\%$ para $116,5 \pm 6,1\%$ (Gráfico 6), sugerindo a ativação da PKG no mecanismo vasorrelaxante da 5,7-DMF.

Outros flavonoides apresentaram efeito vasorrelaxante também por modulação positiva da PKG, a citar a diocleina (GONÇALVES et al., 2009) e scutellarina (YA-JUAN et al., 2015).

Alguns dos alvos da PKG incluem os canais de cálcio dependentes de voltagem e os canais de K^+ . Baseado nisto, foram induzidas contrações com concentrações moderadas (30 mM) ou elevadas (80 mM) de KCl e pode-se observar uma equipotência em o flavonoide relaxar a aorta de rato pré-contráida nestas situações (Gráfico 7), indicando uma possível modulação negativa dos Ca_v , uma vez que, se os canais de potássio estivessem envolvidos, o flavonoide exibiria uma maior potência em relaxar o órgão pré-contráido com 30 mM de KCl. Resultados diferentes foram relatados para a 5,7-DMF isolada de *Kaempferia parviflora*, onde Tep-Areenan, Sawasdee e Randall (2010) descreveram que quando a aorta isolada de rato foi pré-contráida com 60 mM de KCl, a resposta vasorrelaxante do flavonoide foi inibida. Além disso, quando o órgão era pré-incubado com bloqueadores de canais de K^+ , o efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF também era inibido, sugerindo a modulação positiva dos canais de K^+ neste efeito.

Entretanto, Gurney (1994) relatou que abridores de canais de K^+ possuem a capacidade de relaxar com maior efetividade o músculo liso vascular quando a contração é induzida por aumento moderado na $[K^+]_e$ (< 40 mM), e são ineficazes em inibir as contrações quando a concentração extracelular deste íon é aumentada para níveis mais altos, devido a proximidade do potencial de membrana do músculo liso ao potencial de equilíbrio do K^+ , onde o efluxo deste íon e a hiperpolarização são evitados. Esta propriedade distingue os abridores de canais de K^+ dos bloqueadores dos canais de Ca^{2+} , que apresentam comportamentos opostos (GURNEY, 1994).

A grande família dos canais de cálcio dependentes de voltagem, pode ser subdividida em 3 subtipos: Ca_v1 (também conhecido como tipo L), formado por 5 subunidades (α_1 , α_2 , β , δ e γ), sendo a α_1 responsável por estabilizar e formar o poro do canal. Esta família se subdivide ainda em 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4, sendo o 1.2 majoritariamente expresso na musculatura lisa. Todos os bloqueadores de canais de

cálcio utilizados na terapêutica, como nifedipino, anlodipino, agem bloqueando os Ca_V1 , desta forma são canais extremamente importantes em processos patológicos como a hipertensão. Há também Ca_V2 , que estão majoritariamente envolvidos na transmissão sináptica e também se subdividem em 2.1, 2.2 e 2.3. Já o Ca_V3 , está presente majoritariamente em neurônios e se subdivide em 3.1, 3.2 e 3.3 (NILIUS, 1986; TAKAHASHI et al., 1987; TANABE et al., 1987; MORI et al., 1991; DUBEL et al., 1992; WILLIAMS et al., 1992; PEREZ-REYES et al., 1998; CRIBBS et al., 1998; LEE et al., 1999; CATTERALL, 2011; ZAMPONI et al., 2015).

A contração muscular lisa vascular, a qual é originada pelo aumento da concentração de cálcio citosólico, pode ocorrer pelo influxo deste através de canais de cálcio majoritariamente expressos. Este cálcio aumentado no citosol irá se ligar a calmodulina e o complexo formado irá ativar a MLCK, permitindo a interação entre os filamentos de actina e miosina, gerando a contração (SHARIFIMAJD; STÂLHAND, 2014).

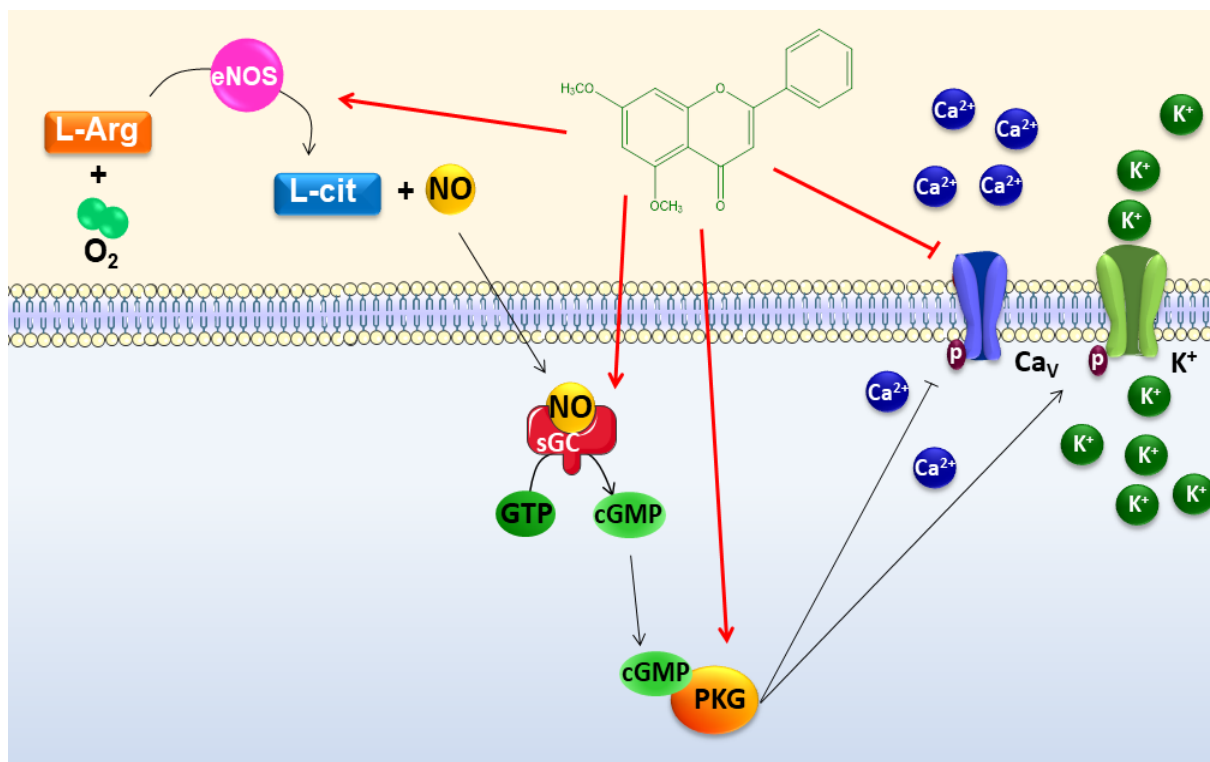
Tendo em vista os indícios sobre o efeito vasorrelaxante promovido pelo flavonoide através da inibição do influxo de cálcio através dos Ca_V , sendo esta a principal forma de contração, resolveu-se confirmar esta hipótese através de uma curva cumulativa de CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem cálcio, na ausência e na presença de diferentes concentrações da 5,7-DMF. Este método é baseado no fato de a despolarização ocasionada pelo aumento da concentração de potássio no meio extracelular ($[\text{K}^+]_e$) ativar os Ca_V , desta forma, todo o Ca^{2+} será proveniente do meio extracelular (REMBOLD, 1996; RATZ; BERG, 2006). E pode-se observar que na presença do flavonoide, as curvas cumulativas de CaCl_2 foram desviadas para a direita com redução do efeito máximo (Gráfico 8), sugerindo que o efeito vasorrelaxante ocasionado pelo flavonoide, provavelmente ocorre por inibição do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V .

Resultados semelhantes corroboram o anteriormente descrito, onde Tep-Areenan, Sawasdee e Randall (2010) descreveram uma possível inibição do influxo de Ca^{2+} . Entretanto, os autores realizaram o experimento na presença de apenas duas concentrações do flavonoide, não sendo construída uma curva concentração-resposta farmacologicamente completa, uma vez que esta necessita de concentrações que apresentem o mínimo e o máximo de efeito (BLUMENTHAL; GARRISON, 2011).

Para confirmar a hipótese de que a 5,7-DMF estaria agindo por inibição do influxo de cálcio através dos Ca_v , foi induzida uma contração com S-(-)- Bay K8644, um agonista seletivo dos Ca_v1 , e observou-se um relaxamento dependente de concentração ($\text{CE}_{50} = 3,5 \pm 0,7 \times 10^{-6} \text{ M}$, Gráfico 9) com um aumento da potência relaxante em torno de 6 vezes em relação a curva de relaxamento da 5,7-DMF na presença de altas concentrações (80 mM) de KCl ($\text{CE}_{50} = 2,2 \pm 0,2 \times 10^{-5} \text{ M}$), indicando então que a 5,7-DMF parece inibir os $\text{Ca}_v1.2$ no seu mecanismo de ação vasorrelaxante (Gráfico 9).

Com base em todos os resultados, pode-se confirmar o efeito vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta de rato e a investigação do mecanismo de ação deste flavonoide indica uma modulação positiva sobre a via do NO/PKG e negativa sobre os Ca_v1 (Figura 15), além de corroborar e complementar o mecanismo de ação desta substância, já descrito anteriormente (TEP-AREENAN; SAWASDEE; RANDALL, 2010).

Figura 15 – Proposta de mecanismo de ação vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta isolada de rato.



O mecanismo vasorrelaxante da 5,7-DMF em aorta de rato promove a modulação positiva da via do NO, bem como inibição do influxo de Ca^{2+} através do bloqueio de Ca_v1 .

Fonte: Modificado de Ferreira (2018).

6 Conclusões

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que a 5,7-DMF, solubilizada em Cremophor[®], e isolada de *Zornia brasiliensis* apresenta atividade espasmolítica não seletiva em:

- Íleo de cobaia, por um provável envolvimento dos receptores muscarínicos;
- Traqueia de cobaia, por um não envolvimento dos fatores relaxantes derivados do epitélio;
- Aorta de rato, por apresentar maior potência relaxante dentre os órgãos testados, e em comparação aos dados anteriores quando esta era solubiliada em DMSO, através dos prováveis mecanismos de ação:
 - Não participação dos receptores muscarínicos;
 - Modulação positiva da via NO/PKG;
 - Não envolvimento dos canais de K⁺, contrapondo-se com o que há relatado na literatura para este flavonoide;
 - Modulação negativa do influxo de Ca²⁺ através dos Ca_v1.

Referências

- ABDALLA, S.; ABU-ZARGA, M.; AFIFI, F.; AL-KHALIL, S.; SABRI, S. Effects of hispidulin, a flavone isolated from *Inula viscosa*, on isolated guinea-pig smooth muscle. **General Pharmacology**, v. 19, n. 4, p. 559-563, 1988.
- AFIFI, F. U.; KHALIL, E.; ABDALLA, S. Effect of isoorientin isolated from *Arum palaestinum* on uterine smooth muscle of rats and guinea pigs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, n. 2, p. 173-177, 1999.
- AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67-76, 2012.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- AITA, K.; IRIE, H.; TANUMA, Y.; TOIDA, S.; OKUMA, Y.; MORI, S.; SHIGA, J. Apoptosis in murine lymphoid organs following intraperitoneal administration of dimethyl sulfoxide (DMSO). **Experimental and Molecular Pathology**, v. 79, p. 265-271, 2005.
- AJAYA, M.; GILANIB, A. H.; MUSTAFAA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 74, p. 603-612, 2003.
- AKINBAMI, L. J.; MOORMAN, J. E.; GARBE, P. L.; SONDIK, E. J. Status of childhood asthma in the United States, 1980-2007. **Pediatrics**, v. 123, n. Supplement 3, p. S131-S145, 2009.
- ALMEIDA-REZENDE, B. A.; PEREIRA, A. C.; CORTES, S. F.; LEMOS, V. S. Vascular effects of flavonoids. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 87-102, 2016.
- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219, n. 6, p. 1698-1705, 1970.
- AMBROZIN, A. R. P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S. Piranoflavonas inéditas e atividades tripanocidas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 740-743, 2008.
- AMEER, O. Z.; SALMAN, I. M.; SIDDIQUI, M. J. A.; YAM, M. F. SRIRAMANENI, R. N.; MOHAMED, A. J.; SADIKUN, A.; ISMAIL, Z.; SHAH, A. M.; ASMAWI, Z. Pharmacological mechanisms underlying the vascular activities of *Loranthus ferrugineus* Roxb. in rat thoracic aorta. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 19-25, 2010.
- ANDRADE, S. S. D. A.; STOPA, S. R.; BRITO, A. S.; CHUERI, P. S.; SZWARCOWALD, C. L.; MALTA, D. C. Prevalência de hipertensão arterial autorreferida na população brasileira: análise da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 2, p. 297-304, 2015.
- ARUNKUMAR, R.; NAIR, S. A.; RAMESHKUMAR, K. B.; SUBRAMONIAM, A. The essential oil constituents of *Zornia diphylla* (L.) Pers, and anti-inflammatory and

antimicrobial activities of the oil (Article). **Records of Natural Products**, v. 8, n. 4, p. 385-393, 2014.

ARUNKUMAR, R.; NAIR, S. A.; SUBRAMONIAM, A. Induction of cell-specific apoptosis and protection of mice from cancer challenge by a steroid positive compound from *Zornia diphylla* (L.) Pers. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 3, p. 233-41, 2012.

AYMARD, G. A. *Zornia*. In: STEYERMARK, J. A.; BERRY, P. E.; YATSKIEVYCH, K.; HOLST, B. K. (ed). Flora of the Venezuela Guayana. **Missouri Botanic Garden Press**. St. Louis. v. 5, 1999.

AZUMA, T.; KAYANO, S. I.; MATSUMURA, Y.; KONISHI, Y.; TANAKA, Y.; KIKUZAKI, H. Antimutagenic and α -glucosidase inhibitory effects of constituents from *Kaempferia parviflora*. **Food chemistry**, v. 125, n. 2, p. 471-475, 2011.

BAE, S.; D'CUNHA, R.; SHAO, J.; AN, G. Effect of 5,7-dimethoxyflavone on Bcrp1-mediated transport of sorafenib *in vitro* and *in vivo* in mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 117, p. 27-34, 2018.

BARBOSA, M. R. V.; LIMA, J. R.; CUNHA, J. P.; AGRA, M. F.; THOMAS, W. W. Vegetação e flora no Cariri Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, p. 313-322, 2007.

BATISTA, T. M. **Avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroalcolóico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* Vog. (Fabaceae)**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

BELCAVELLO, L.; CUNHA, M. R. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. C. P. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza online**, v. 10, n. 3, p. 140-145, 2012.

BERRIDGE, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 21, p. 5047-5061, 2009.

BILLINGTON, C. K.; PENN, R. B. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. **Respiratory Research**, v. 4, n. 1, p. 2, 2003.

BLUMENTHAL, D. K.; GARRISON, J. C. Pharmacodynamics: Molecular mechanisms of drug action. In: BRONTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Org.). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11. ed. USA: Mc Graw Hill. cap. 3, p. 44, 2011.

BOLTON, T. B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 606-718, 1979.

BONAVENTURA, D.; DE LIMA, R. G.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. NO donors-relaxation is impaired in aorta from hypertensive rats due to a reduced involvement of K^+ channels and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. **Life Sciences**, v. 89, p. 595-602, 2011.

BRAHMACHARI, G.; GHOSH, S.; MONDAL, S.; JASH, S. K.; MANDAL, L. C.; MONDAL, A. Cyclic voltammetric studies with plant extracts of some traditionally

used Indian medicinal plants to evaluate their antioxidant potential. **Biochemistry: An Indian Journal**, v. 3, n. 1, p. 32-35, 2009.

BRAMAN, S. S. The global burden of asthma. **Chest**, v. 130, n. 1, p. 4S-12S, 2006.

BRANDÃO, A. A.; RODRIGUES, C. I. S.; CONSOLIM-COLOMBO, F.; PLAVNIK, F. L.; MALACHIAS, M. V. B.; KOHLMANN JUNIOR, O.; FERREIRA FILHO, S. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros Cardiologia**, v. 95, n. 4, p. 553-553, 2010.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P. D. L.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. 7ª DIRETRIZ BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. Disponível em: <www.arquivosonline.com.br>. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v. 107, n. 3, Supl. 3, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Acesso em: 08 de fevereiro de 2018.

BREYER, M. D.; HAO, C. M.; QI, Z. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors and the kidney. **Current Opinion in Critical Care**, v. 7, n. 6, p. 393-400, 2001.

BROWN, J. H.; TAYLOR, P. Muscarinic receptor agonists and antagonists. In: BRONTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Org.). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11. ed. USA: Mc Graw Hill. cap. 7, p. 183-200, 2012.

BRUNNING, T. A.; HENDRICK, M. G. C.; CHANG, P. C.; KUYPERS, E. A. P.; VAN ZWIETEN, P. A. In vivo characterization of vasodilating muscarinic receptors in human. **Circulatory Research**, v. 74, p. 912-919, 1994.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CAPASSO, A.; PINTO, A.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F. Reduction of agonist-induced contractions of guinea-pig isolated ileum by flavonoids. **Phytotherapy Research**, v. 5, n. 2, p. 85-87, 1991.

CARRÓN, R.; SANZ, E.; PUEBLA, P.; MARTÍN, M. L.; SAN ROMÁN, L.; GUERRERO, M. F. Mechanisms of relaxation induced by flavonoid ayanin in isolated aorta rings from Wistar rats. **Colombia Medica**, v. 41, n. 1, p. 10-16, 2010.

CARVALHO, M. H. C.; NIGRO, D.; LEMOS, V. S.; TOSTES, R. D. C. A.; FORTES, Z. B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 76-88, 2001.

CATTERALL, W. A. Voltage-gated calcium channels. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, p. 1-24, 2011.

- CHANG, G. J.; LIN, T. P.; KO, Y. S.; LIN, M. S. Endothelium-dependent and-independent vasorelaxation induced by CIJ-3-2F, a novel benzyl-furoquinoline with antiarrhythmic action, in rat aorta. **Life Sciences**, v. 86, n. 23, p. 869-879, 2010.
- CHATEAU, M.T.; GINESTIER-VERNE, C.; CHIESA, J.; CARAVANO, R.; BUREAU, J.P. Dimethyl sulfoxide-induced apoptosis in human leukemic U937 cells. **Analytical Cellular Pathology**, v. 10, p. 75–84, 1996.
- CHEN, J. L.; KO, W. C. Relaxation of isolated guinea-pig trachea by apigenin, a constituent of celery, via inhibition of phosphodiesterase. **European Journal of Pharmacology**, v. 811, p. 129-133, 2017.
- CHIAPPETA, A. D. A.; DE MELO, J. F.; Higher Plants with biological activity. Plants of Pernambuco. II. III. **Revista do Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Recife**, v. 11, n.1/2, p. 99-111, 1984.
- CONCEIÇÃO, K. N.; SAMPAIO, F. A. S. A.; DA SILVA, V. F.; DA SILVA, A. O. Poder antioxidante de carotenoides, flavonoides e vitamina e na prevenção da arteriosclerose. **Revista Ciência & Saberes-Facema**, v. 2, n. 4, p. 320-324, 2017.
- COSTA, E. V.; MENEZES, L. R. A.; ROCHA, S. L.; BALIZA, I. R. S.; DIAS, R. B.; ROCHA, C. A. G.; BALIZA4, I. R. S.; DIAS, R. B.; ROCHA, C. A. G.; SOARES, M. B. P.; BEZERRA, D. P. Antitumor properties of the leaf essential oil of *Zornia brasiliensis*. **Planta Médica**, v. 81, p. 563-5637, 2015.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.
- CRIBBS, L. L.; LEE, J. H.; YANG, J.; SATIN, J.; ZHANG, Y.; DAUD, A.; BARCLAY, J.; WILLIAMSON, M. P.; FOX, M.; REES, M.; PEREZ-REYES, E. Cloning and characterization of $\alpha 1H$ from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family. **Circulation Research**, v. 83, n. 1, p. 103-109, 1998.
- CUSPIDI, C.; TADIC, M.; GRASSI, G.; MANCIA, G. Treatment of hypertension: The ESH/ESC guidelines recommendations. **Pharmacological Research**, p. 1-7, 2017.
- DANIEL, E. E.; KWAN, C.Y.; JANSSEN, L. Pharmacological techniques for the *in vitro* study of intestinal smooth muscle. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 45, p. 159, 2001.
- DANILA, C. I.; HAMILTON, S. L. Phosphorylation of ryanodine receptors. **Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 521-525, 2004.
- DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299-315, 2015.
- DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, H. N.; BRANCO, A.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V.; QUEIROZ, L. P.; GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidante and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 215-218, 2007.

- DINIZ, L. R. L.; ABÍLIO, G. M. F.; LOPES, J. D.; PAULO, M. Q. Avaliação toxicológica e microbiológica dos extratos da *Zornia brasiliensis* (Leguminosae - Papilionoidae). In: I Congresso Brasileiro de Extensão Universitária, João Pessoa-PB. Disponível em: <http://www.prac.ufpb.br/anais/lcbeu_anais/anais/saude/zornia.pdf>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2016. 2002.
- DINIZ, M. F. F. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; MEDEIROS, A. C. D.; MALTA-JÚNIOR, A. **Memento fitoterápico**. As plantas como alternativa terapêutica: aspectos populares e científicos. João Pessoa: ed. Universitária/UFPB, p. 119-122, 1998.
- DO NASCIMENTO, S. C.; DE MELO, J. F.; CHIAPPETA, A. D. A. Cytotoxic agentes. Experiments with KB cells. **Revista do Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Recife**, v. 22, n. 1/2, p. 19-26, 1985.
- DOWELL, M. L.; LAVOIE, T. L.; SOLWAY, J.; KRISHNAN, R. Airway smooth muscle: a potential target for asthma therapy. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 20, n. 1, p. 66-72, 2014.
- DOYLE, J. J.; LUCKOW, M. A. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Update on phylogeny. **Plant Physiology**, v. 131, p. 900-910, 2003.
- DUBEL, S. J.; STARR, T. V.; HELL, J.; AHLIJANIAN, M. K.; ENYEART, J. J.; CATTERALL, W. A.; SNUTCH, T. P. Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 11, p. 5058-5062, 1992.
- DUDZINSKI, D. M.; IGARASHI, J.; GREIF, D.; MICHEL, T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 46, p. 235-276, 2006.
- DUTTA, K.; CARMODY, M. W.; CALA, S. E.; DAVIDORFF, A. J. Depressed PKA activity contributes to impaired SERCA function and is linked to the pathogenesis of glucose-induced cardiomyopathy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, n. 8, p. 985-996, 2002.
- ECKERT, R. E.; KARSTEN, A. J.; UTZ, J.; ZIEGLER, M. Regulation of renal artery smooth muscle tone by α_1 -adrenoceptors: role of voltage-gated calcium channels and intracellular calcium stores. **Urological Research**, v. 28, n. 2, p. 122-127, 2000.
- EDWARDS, G.; WESTON, A. H. Potassium channel openers and vascular smooth muscle relaxation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 48, p. 237 - 258, 1990.
- EIKEN, O.; MEKJAVIC, I. B.; KÖLEGÅRD, R. Blood pressure regulation V: in vivo mechanical properties of precapillary vessels as affected by long-term pressure loading and unloading. **European Journal of Applied Physiology**, v. 114, n. 3, p. 499-509, 2014.
- ESTRADA-SOTO, S.; RODRÍGUEZ-AVILEZ, A.; CASTANEDA-AVILA, C.; CASTILLO-ESPANA, P.; NAVARRETE-VÁZQUEZ, G.; HERNÁNDEZ, L.; AGUIRRE-CRESPO, F. Spasmolytic action of *Lepechinia caulescens* is through calcium channel blockade and NO release. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n.3, p. 364-370, 2007.

FEHER, J. Smooth Muscle. **Quantitative Human Physiology**, p. 283-293, 2012.

FERRANTE, J.; LUCHOWSKI, E.; RUTLEDGE, A.; TRIGGLE, D. J. Binding of A 1, 4-dihydropyridine calcium channel activator, S(-) Bay K 8644, to cardiac preparations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 158, n. 1, 149-154, 1989.

FERREIRA, S. R. D. Atividade tocolítica *in vitro* do extrato etanólico e flavonoides isolados de *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) em ratas. **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2018.

FIELD, M.; SEMRAD, C. E. Toxigenic diarrheas, congenital diarrheas, and cystic fibrosis: Disorders of intestinal ion transport. **Annual Review of Physiology**, v. 55, p. 631-655, 1993.

FITZPATRICK, D. F.; HIRSCHFIELD, S. L.; COFFEY, R. G. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. **Annual Journal of Physiology**, v. 265, p. H774–H778, 1993.

FLAVAHAN, N. A.; VANHOUTTE, P. M. α_1 -Adrenoceptor subclassification in vascular smooth muscle. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 7, p. 347-349, 1986.

FORTUNA-PEREZ, A. P.; LEWIS, G. P.; QUEIROZ, R. T.; SANTOS-SILVA J.; TOZZI, A. M. G. A.; RODRIGUES, K. F. Fruit as diagnostic characteristic to recognize Brazilian species of *Zornia* (Leguminosae, Papilionoideae). **Phytotaxa**, v. 219, n. 1, p.027–042, 2015.

FORTUNA-PEREZ, A. P.; SILVA, M. J.; QUEIROZ, L. P.; LEWIS, G. P.; SIMÕES, A. O.; AZEVEDO, T.; GOULART, A. M.; TIINA, S.; SOUZA, A. P. Phylogeny and biogeography of the genus *Zornia* (Leguminosae: Papilionoideae: Dalbergieae). **Taxon**, v. 62, p. 723–732, 2013.

FORTUNA-PEREZ, A. P.; TOZZI, A. M. G. A. Nomenclatural changes for *Zornia* (Leguminosae, Papilionoideae, Dalbergieae) in Brazil. **Novon**, v. 21, p. 331–337, 2011.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CANHOS, D. A. L.; CARVALHO JÚNIOR, A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; LUGHADHA, E. N.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, S. de; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. Síntese da diversidade brasileira. (Ed.). **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**, v. 1, p. 21-42, 2010.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. **British Journal of Anaesthesia**, v. 93, n. 1, p. 105-113, 2004.

GALVAO, J.; DAVIS, B.; TILLEY, M.; NORMANDO, E.; DUCHEN, M. R.; CORDEIRO, M. F. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 3, p. 1317-1330, 2014.

GHARZOULI, K.; HOLZER, P. Inhibition of guinea pig intestinal peristalsis by the flavonoids quercetin, naringenin, apigenin and genistein. **Pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 5-14, 2004.

GHAYUR, M. N.; KHAN, H.; GILANI, A. H. Antispasmodic, bronchodilator and vasodilator activities of (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, n. 8, p. 970-975, 2007.

GOMES, J. M. **Avaliação da atividade antioxidante e fotoprotetora de *Calliandra umbellifera* e *Zornia brasiliensis* (Fabaceae)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

GONÇALVES, R. L.; LUGNIER, C.; KERAVALIS, T.; LOPES, M. J.; FANTINI, F. A.; SCHMITT, M.; CORTES, S. F.; LEMOS, V. S. The flavonoid dioclein is a selective inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 1 (PDE1) and a cGMP-dependent protein kinase (PKG) vasorelaxant in human vascular tissue. **European Journal of Pharmacology**, v. 620, n. 1-3, p. 78-83, 2009.

GREETHA, K. M.; SHILPA, S.; MURUGAN, V. Anticonvulsant activity of the methanolic extract of whole plant of *Zornia diphylla* (Linn) Pers. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n. 7, p. 3670-3672, 2012.

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, I. A. D. Endothelium dependent hypotensive and vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Mentha x villosa* in rats. **Phytomedicine**, v. 11, p. 490–497, 2004.

GUERRERO, M. F.; PUEBLA, P.; CARRÓN, R.; MARTÍN, M. L.; SAN ROMÁN, L. Quercetin 3, 7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeianus* Schlecht. **Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, p. 1373–1378, 2002.

GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 242 - 251, 1994.

HAIT, W. N. (Ed.). **Drug Resistance**. Springer Science & Business Media, v. 87, p. 165, 2012.

HAMMAD, H. M.; ABDALLA, S. S. Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activity relationship. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 28, n. 5, p. 767-771, 1997.

HANSLICK, J. L.; LAU, K.; NOGUCHI, K. K.; OLNEY, J. W.; ZORUMSKI, C. F.; MENNERICK, S.; FARBER, N. B. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. **Neurobiology of Disease**, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2009.

HEGNAUER, R.; GRAYER-BARKMEIJER, R. J.; Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: A chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, v. 34. n. 1, p. 3-16, 1993.

- HERNÁNDEZ-ABREU, O.; CASTILLO-ESPAÑA, P.; LEÓN-RIVERA, I.; IBARRA-BARAJAS, M.; VILLALOBOS-MOLINA, R.; GONZÁLEZ-CHRISTEN, J.; VERGARA-GALICIA, J.; ESTRADA-SOTO, S. Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, n. 1, p. 54-61, 2009.
- HILL-EUBANKS, D. C.; WERNER, M. E.; HEPPNER, T. J.; NELSON, M. T. Calcium signaling in smooth muscle. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, p. 1-21, 2011.
- HIRANO, K.; DERKACH, D. N.; HIRANO, M.; NISHIMURA, J.; KANAIDE, H. Protein kinase network in the regulation of phosphorylation and dephosphorylation of smooth muscle myosin light chain. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 248, n. 1-2, p. 105-14, 2003.
- HNATYSZYN, O.; MOSCATELLI, V.; RONDINA, R.; COSTA, M.; ARRANZ, C.; BALASZCZUK, A.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of guinea pig corpus cavernosum. **Phytomedicine**, v. 11, n. 4, p. 366-369, 2004.
- HORI, M.; KARAKI, H. Regulatory mechanisms of calcium sensitization of contractile elements in smooth muscle. **Life Science**, v. 62, p. 1689–1633, 1998.
- IAPT (International Association for Plant Taxonomy). **International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)**. CHAPTER III: Nomenclature of taxa according to their rank. Disponível em: < <http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php?page=art18>>. Acesso em 20 de Janeiro de 2018. 2012.
- IBARRA-ALVORADO, C.; GALLE, J.; MELICHAR, V. O.; MAMEGHANI, A.; SCHMIDT, H. H. H. W. Phosphorylation of blood vessel vasodilator-stimulated phosphoprotein at serine 239 as a functional biochemical marker of endothelial nitric oxide/cyclic GMP signaling. **Molecular Pharmacology**, v. 61, p. 312-319, 2002.
- IGNARRO, L. J. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. **Hypertension**, v. 16, n. 5, p. 477-483, 1990.
- IHARA, E.; MACDONALD, J. A. The regulation of smooth muscle contractility by zipper-interacting protein kinase. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 85, n. 1, p. 79-87, 2007.
- IVEY, K. L.; HODGSON, J. M.; CROFT, K. D.; LEWIS, J. R.; PRINCE, R. L. Flavonoid intake and all-cause mortality. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 101, n. 5, p. 1012-1020, 2015.
- JACKSON, W. F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, n. 1, p. 173-178, 2000.
- JANSSEN, L. J. Asthma therapy: how far have we come, why did we fail and where should we go next? **European Respiratory Journal**, v. 33, n. 1, p. 11-20, 2009.

JEFFERY, T. K.; WANSTALL, J. C. Pulmonary vascular remodelling in hypoxic rats: effects of amlodipine, alone and with perindopril. **European Journal of Pharmacology**, v. 416, n. 1-2, p. 123-131, 2001.

JIN, S. N.; WEN, J. F.; LI, X.; KANG, D. G.; LEE, H. S.; CHO, K. W. The mechanism of vasorelaxation induced by ethanol extract of *Sophora flavescens* in rat aorta, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 547–552, 2011.

JOHNSTON, S. L.; FREEZER, N. J.; RITTER, W.; O'TOOLE, S.; HOWARTH, P. H. Prostaglandin D₂-induced bronchoconstriction is mediated only in part by the thromboxane prostanoid receptor. **European Respiratory Journal**, v. 8, n. 3, p. 411-415, 1995.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 13 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

JOYNER, M. J.; LIMBERG, J. K. Blood pressure regulation: every adaptation is an integration? **European Journal of Applied Physiology**, v. 114, n. 3, p. 445-450, 2014.

KANG, Y. G.; CHOI, E. J.; CHOI, Y.; HWANG, J. K. 5, 7-Dimethoxyflavone induces melanogenesis in B16F10 melanoma cells through cAMP-dependent signalling. **Experimental Dermatology**, v. 20, n. 5, p. 445-447, 2011.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K. I.; HARADA, K. I.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K. J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 49, n. 2, p. 157-230, 1997.

KIM, E. Y.; LEE, Y. J.; RHYU, M. R. Black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) relaxes the isolated rat thoracic aorta through endothelium-dependent and independent mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v.138, p. 537–542, 2011.

KIM, H. R.; APPEL, S.; VETTERKIND, S.; GANGOPADHYAY, S. S.; MORGAN, K. G. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, p. 2165-2180, 2008.

KIM, J. K.; MUN, S.; KIM, M. S.; KIM, M. B.; SA, B. K.; HWANG, J. K. 5, 7-Dimethoxyflavone, an activator of PPAR α/γ , inhibits UVB-induced MMP expression in human skin fibroblast cells. **Experimental dermatology**, v. 21, n. 3, p. 211-216, 2012.

KIMURA, K.; ITO, M.; AMANO, M.; CHIHARA, K.; FUKATA, Y.; NAKAFUKU, M. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Science**, v. 273, p. 254-248, 1996.

KJELDSEN, S. E. Hypertension and cardiovascular risk: general aspects. **Pharmacological Research**, p. 1-21, 2017.

KLOOS, H.; THIONGO, F. W.; OUMA, J. H.; BUTTERWORTH, A. E. Preliminary evaluation of some wild and cultivated plants for snail control in machakos district, Kenya. **Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 197-204, 1987.

- KOBAYASHI, H.; SUZUKI, R.; SATO, K.; OGAMI, T.; TOMOZAWA, H.; TSUBATA, M.; ICHINOSE, K.; ABURADA, M.; OCHIAI, W.; SUGIYAMA, K.; SHIMADA, T. Effect of *Kaempferia parviflora* extract on knee osteoarthritis. **Journal of Natural Medicines**, p. 1-9, 2018.
- KOLANKIEWICZ, F.; GIOVELLI, F. M. H.; BELLINASCO, M. L. Estudo do perfil lipídico e da prevalência de dislipidemias em adultos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 4, p. 317-320, 2008.
- KRYCH, J.; GEBICKA, L. Catalase is inhibited by flavonoids. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 148-153, 2013.
- LAXANE, S. N.; SWARNKAR, S. K.; SETTY, M. M. Antioxidant studies on the ethanolic extract of *Zornia gibbosa*. **Pharmacologyonline**, v.1, p. 319-330, 2008.
- LAXANE, S. N.; SWARNKAR, S. K.; ZANWAR, S. B.; MANJUNATH SETTY, M. Antiinflammatory studies of the alcoholic extract of *Zornia gibbosa*. **Pharmacology online**, v. 1, p. 67-76, 2011.
- LEAL, L. K.; COSTA, M. F.; PITOMBEIRA, M.; BARROSO, V. M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANA, G. S. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. **Life Sciences**, v. 79, n. 1, p. 98-104, 2006.
- LEE, J. H.; GOMORA, J. C.; CRIBBS, L. L.; PEREZ-REYES, E. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block $\alpha 1H$. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 6, p. 3034-3042, 1999.
- LEE, K. J. Pharmacologic agents for chronic diarrhea. **Intestinal Research**, v. 13, n. 4, p. 306-312, 2015.
- LEMOES, V. S.; FREITAS, M. R.; MULLER, B.; LINO, Y. D.; QUEIROGA, C. E.; CÔRTEZ, S. F. Dioclein, a new nitric oxide-and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. **European Journal of Pharmacology**, v. 386, n. 1, p. 41-46, 1999.
- LEUNER, O.; HAVLIK, J.; PROKUDINA, J. H. E.; NOVY, P.; KOKOSKA, L. Distribution of isoflavones and coumestrol in neglected tropical and subtropical legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 15, 2012.
- LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the world. **Kew Royal Botanic Gardens**, 2005.
- LI, H.; ZHANG, X.; WANG, W. Anticancer activity of 5,7-dimethoxyflavone against liver cancer cell line HepG2 involves apoptosis, ROS generation and cell cycle arrest. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 14, n. 4, p. 213, 2017.
- LIMA, H. C.; QUEIROZ, L. P.; MORIM, M. P.; DUTRA, V. F.; BORTOLUZZI, R. L. C.; IGANCI, J. R. V.; FORTUNATO, R. H.; VAZ, A. M. S. F.; SOUZA, E. R.; FILARDI, F. L. R.; GARCIA, F. C. P.; FERNANDES, J. M.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREZ, A. P. F.; MANSANO, V. F.; MIOTTO, S. T. S.; LIMA, L. C. P.; OLIVEIRA, M. L. A. A.; FLORES, A. S.; TORKE, B. M.; PINTO, R. B.; LEWIS, G. P.; BARROS, M. J. F.; SCHÜTZ, R.; PENNINGTON, T.; KLITGAARD, B. B.; RANDO, J. G.; SCALON, V. R.; COSTA, L. C.; SILVA, M. J.; MOURA, T. M.; BARROS, L. A. V.; SILVA, M. C.

- R.; QUEIROZ, R. T.; SARTORI, A. L. B.; CAMARGO, R. A.; LIMA, I. B.; COSTA, J.; SOARES, M. V. B.; SNAK, C.; VALLS, J. F. M.; SÃO-MATEUS, W.; FALCÃO, M. J.; CARDOSO, D. B. O. S.; TOZZI, A. M. G. A.; MARTINS, V. C.; SOUZA, V. C.; MEIRELES, J. E.; REIS, I. P. Fabaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000115>> Acesso em 15 de Setembro de 2016. 2015.
- LIMA, J. T. Mecanismo de ação espasmolítica de diplotropina em íleo de cobaia e útero de rata e estudo comparativo do seu análogo sintético. **Tese (Doutorado)** - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2008.
- LIU, B.; YANG, J.; WEN, Q.; LI, Y. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, relaxes guinea-pig tracheal smooth muscle in vitro and in vivo: role of cGMP/PKG pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1-3, 257-266, 2008.
- LIU, J.; PENG, C.; ZHOU, Q. M.; GUO, L.; LIU, Z. H.; XIONG, L. Alkaloids and flavonoid glycosides from the aerial parts of *Leonurus japonicus* and their opposite effects on uterine smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 145, p. 128-136, 2018.
- LÓPEZ, R. E. S.; SANTOS, B. C. *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **Fitos**, v. 9, p. 161-252, 2015.
- LPWG (The Legume Phylogeny Working Group). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, p. 44-77, 2017.
- LPWG (The Legume Phylogeny Working Group). Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, p. 217-248, 2013.
- MA, J.; PAN, Z. Retrograde activation of store-operated calcium channel. **Cell Calcium**, v. 33, n. 5-6, p. 375-384, 2003.
- MACÊDO, C. L.; VASCONCELOS, L. H. C.; CORREIA, A. C. C.; MARTINS, I. R. R.; LIRA, D. P.; SANTOS, B. V. O.; SILVA, B. A. Spasmolytic effect of galetin 3,6-dimethyl ether, a flavonoid obtained from *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 47, p. 183, 2011.
- MARTINS, J. L.; RODRIGUES, O. R.; SOUSA, F. B.; FAJEMIROYE, J. O.; GALDINO, P. M.; FLORENTINO, I. F.; COSTA, E. A. Medicinal species with gastroprotective activity found in the Brazilian Cerrado. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 29, n. 3, p. 238-251, 2015.
- MESSIAS, M. C. T. B.; MENEGATTO, M. F.; PRADO, A. C. C.; SANTOS, B. R.; GUIMARÃES, M. F. M. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, p. 76-104, 2015.
- MINNEMAN, K. P.; THEROUX, T. L.; HOLLINGER, S.; HAN, C.; ESBENSHADE, T. A. Selectivity of agonists for cloned alpha 1-adrenergic receptor subtypes. **Molecular Pharmacology**, v. 46, n. 5, p. 929-936, 1994.

- MISHRA, S. K.; ABBOT, S. E.; CHOUDHURY, Z.; CHENG, M.; KHATAB, N.; MAYCOCK, N. J.; ZAVERY, A.; AARONSON, P. I. Endothelium-dependent relaxation of rat aorta and main pulmonary artery by the phytoestrogens genistein and daidzein. **Cardiovascular Research**, v. 46, p. 539-46, 2000.
- MOHLENBROCK, R. H. A. Monograph of the leguminous genus *Zornia*. **Webbia**, v. 16, p. 112-113, 1961.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S193-S201, 2006.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Review**, v. 43, p. 109-142, 1991.
- MORELLO, S.; VELLECCO, V.; ALFIERI, A.; MASCOLO, N.; CICALA, C. Vasorelaxant effect of the flavonoid galangin on isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 78, p. 825-830, 2006.
- MORGAN, K. The role of calcium in the control of vascular tone as assessed by the Ca^{2+} indicator aequorin. **Cardiovascular Drugs**, v. 4, p. 1355-1362, 1990.
- MORI, Y.; FRIEDRICH, T.; KIM, M. S.; MIKAMI, A.; NAKAI, J.; RUTH, P.; BOSSE, E.; HOFMANN, F.; FLOCKERZI, V.; FURUICHI, T.; MIKOSHIBA, K.; IMOTO, K.; TANABE, T.; NUMA, S. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. **Nature**, v. 350, n. 6317, p. 398, 1991.
- MURTADA, S. I.; HOLZAPFEL, G. A. Investigating the role of smooth muscle cells in large elastic arteries: A finite element analysis. **Journal of Theoretical Biology**, v. 358, n. 0, p. 1-10, 2014.
- MURTHY, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 345-374, 2006.
- MUSTAFA, E. H.; ZARGA, A.; ABDALLA, S. Effects of cirsiol, a flavone isolated from *Achillea fragrantissima*, on rat isolated ileum. **General Pharmacology**, v. 23, n. 3, p. 555-560, 1992.
- NASCIMENTO, Y. M.; ABREU, L. S.; LIMA, R. L.; SILVA, A. D. S.; COSTA, V. C. O.; MELO, J. I. M.; SCOTTI, M. T.; SOBRAL, M. V.; ARAUJO, S. S.; GOMES-FILHO, M. A.; SILVA, M. S.; TAVARES, F. J. Zornioside, a dihydrochalcone C-glycoside, and other compounds from *Zornia brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2018.
- NASCIMENTO, Y.; ABREU, L.; LIMA, R.; MELO, J.; SILVA, M.; TAVARES, J. Identification of triterpenic saponin by HPLC-DADMS/MS in *Zornia brasiliensis*. **MOL2NET**, v. 2, p. 1-5, 2016.
- NEAMSUVAN, O.; KOMONHIRAN, P.; BOONMING, K. Medicinal plants used for hypertension treatment by folk healers in Songkhla province, Thailand. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 214, p. 58-70, 2018.

- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.
- NILIUS, B. Possible functional significance of a novel type of cardiac Ca^{2+} channel. **Biomedica Biochimica Acta**, v. 45, n. 8, p. K37-45, 1986.
- OBI, C. L.; RAMALIVHANA, J.; SAMIE, A.; IGUMBOR, E. O. Prevalence, pathogenesis, antibiotic susceptibility profiles, and in vitro activity of selected medicinal plants against *Aeromonas* isolated from stool samples of patients in the venda region of South Africa. **Journal Health Population Nutrition**, v. 25, n. 4, p. 428-235, 2007.
- OLIVEIRA, F. R. M. B. Investigação da atividade espasmolítica de *Zornia brasiliensis* Vogel. (Leguminosae). In: **IV Encontro Unificado de Pesquisa e Extensão da UFPB**. João Pessoa-PB, 2016a.
- OLIVEIRA, F. R. M. B. **O extrato etanólico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) apresenta atividade antidiarreica em camundongos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016b.
- OLIVEIRA, F. R. M. B.; FERREIRA, S. R. D.; MORENO, G. T. A.; SILVA, A. D. S.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; CAVALCANTE, F. A. Avaliação da atividade antidiarreica do extrato etanólico obtido das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) em camundongos. In: **IX Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**, 2013, Goiânia. IX Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2013.
- OLIVEIRA, F. R. M. B.; FERREIRA, S. R. D.; MORENO, G. T. A.; SILVA, A. D. S.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; CAVALCANTE, F. A. Ação espasmolítica de *Zornia brasiliensis* Vogel. (Leguminosae) envolve bloqueio do influxo de cálcio em íleo de cobaia. In: **IX Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 2014, João Pessoa. Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE Regional, 2014.
- ORALLO, F. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. **Pharmacology Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 153-71, 1996.
- PAN, Z.; FENG, T.; SHAN, L.; CAI, B.; CHU, W.; NIU, H.; LU, Y.; YANG, B. Scutellarin-induced endothelium-independent relaxation in rat aorta. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 11, p. 1428-1433, 2008.
- PANTHONG, A.; TASSANEEYAKUL, W.; KANJANAPOTHI, D.; TANTIWACHWUTTIKUL, P.; REUTRAKUL, V. Anti-inflammatory activity of 5,7-dimethoxyflavone. **Planta medica**, v. 55, n. 02, p. 133-136, 1989.
- PELAIA, G.; GALLELLI, L.; VATRALLA, A.; GREMBIALE, R.D.; MASELLI, R.; DE SARRO, G.B.; MARSICO, S. A Potential role of potassium channel openers in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Life Science**, v. 70, p. 977-990. 2002.
- PEREIRA, A. C.; PAULO, M.; ARAÚJO, A. V.; RODRIGUES, G. J.; BENDHACK, L. M. Nitric oxide synthesis and biological functions of nitric oxide released from

ruthenium compounds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 9, p. 947-57, 2011.

PEREZ, A. P. F. O gênero *Zornia* J. F. Gmel. (Leguminosae, Papilionoideae, dalbergiae): Revisão taxonômica das espécies ocorrentes no Brasil e filogenia. **Tese (Doutorado)**, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

PEREZ-REYES, E.; CRIBBS, L. L.; DAUD, A.; LACERDA, A. E.; BARCLAY, J.; WILLIAMSON, M. P.; FOX, M.; REES, M.; LEE, J. H. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. **Nature**, v. 391, n. 6670, p. 896, 1998.

PINHEIRO, P. F.; JUSTINO, G. C. **Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds – A Review of Spectroscopic Applications**. In: Phytochemicals – A Global Perspective of their Role in Nutrition and Health, Dr Venketeshwer Rao (Ed.). 2012.

PIRES, S. D. S.; DE ASSIS, T. S.; DE ALMEIDA, R. N.; JULIEN, C.; DE MEDEIROS, I. A. Endothelium-derived nitric oxide is involved in the hypotensive and vasorelaxant responses induced by the aqueous fraction of the ethanolic extract of the leaves of *Albizia inopinata* (Harms) GP Lewis in rats. **Phytomedicine**, v. 7, n. 2, p. 91-98, 2000.

POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonols: old compounds for old roles. **Annals of Botany**, v. 108, p. 1225-1233, 2011.

PRATI, C.; DEMOUGEOT, C.; GUILLOT, X.; GODFRIN-VALNET, M.; WENDLING, D. Endothelial dysfunction in joint disease. **Joint Bone Spine**, v. 81, n. 5, p. 386-91, 2014.

PUETZ, S.; LUBOMIROV, L. T.; PFITZER, G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. **Physiology** (Bethesda, Md.), v. 24, p. 342-356, 2009.

RAGAB, F. A.; YAHYA, T. A. A.; EL-NAA, M. M.; ARAFA, R. K. Design, synthesis and structure–activity relationship of novel semi-synthetic flavonoids as antiproliferative agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 82, p. 506-520, 2014.

RANDO, J. G. Fabaceae. In: Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115>>. Acesso em 20 de Setembro de 2016. 2016.

RATZ, P. H.; BERG, K. M. 2-Aminoethoxydiphenyl borate inhibits KCl-induced vascular smooth muscle contraction. **European Journal of Pharmacology**, v. 541, n. 3, p. 177-183, 2006.

REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; SCHULZ, R.; HODSON, H. F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxid synthase *in vitro* and *in vivo*. **British Journal of Pharmacology**, v. 101, p. 746-752, 1990.

REIS, A. P. M.; SOUZA, A. G.; FERREIRA, G. C. O.; OLIVEIRA, J. M. R.; VENANCIO, J. C.; FERNANDES, T. M.; MACHADO, V. C. S.; RIBEIRO, V. C. N.

Prevalência de internações hospitalares por insuficiência cardíaca no Brasil: um problema de saúde pública. **Revista Educação em Saúde**, v. 4, n. 2, 2016.

REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, n. 2, p. 129-137, 1992.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction*. San Diego, **Academic Press**, p. 227 – 239, 1996.

REN, F. Z.; GAO, Y. Q.; CHENG, X. X.; LI, L. H.; CHEN, S. H.; ZHANG, Y. L. Study on chemical constituents of *Zornia diphylla*. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v. 03, 2012.

RIBEIRO, L. A. A. Participação da via AC-AMPC-PKA na resposta relaxante induzida pelo ácido 8(17), 12E, 14-labdatrieno-18-óico (labdano-302) em músculos lisos. **Tese (Doutorado)** - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2007.

ROJAS, A.; BAH, M.; ROJAS, J. I.; SERRANO, V.; PACHECO, S. Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Querétaro (México) for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytomedicine**, v. 6, p. 367-371, 1999.

ROJAS, A.; CRUZ, S.; RAUCH, V.; BYE, R.; LINARES, E.; MATA, R. Spasmolytic potential of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytomedicine**, vol. 2, p. 51-55, 1995.

ROUQUAYROL, M. Z.; FONTELES, M. C.; ALENCAR, J. E.; MATOS, F. J. A.; CRAVEIRO, A. A. Molluscicidal activity of essential oils from Northeastern Brazilian plants. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica**, v. 13, p. 135-143, 1980.

SAE-WONG, C.; MATSUDA, H.; TEWTRAKUL, S.; TANSAKUL, P.; NAKAMURA, S.; NOMURA, Y.; YOSHIKAWA, M. Suppressive effects of methoxyflavonoids isolated from *Kaempferia parviflora* on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 488-495, 2011.

SANDOO, A.; VAN ZANTEN, J. J. V.; METSIOS, G. S.; CARROLL, D.; KITAS, G. D. The endothelium and its role in regulating vascular tone. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, v. 4, p. 302, 2010.

SANTOS, M. R. V.; CARVALHO, A. A.; MEDEIROS, I. A.; ALVES, P. B.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A. R. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 186-191, 2007.

SANTOS, R. F. Ação espasmolítica de retusin, flavonoide isolado de *Solanum paludosum* Moric., e de seu derivado metilado em íleo isolado de cobaia. **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2007.

SATO, Y.; HE, J. X.; NAGAI, H.; TANI, T.; AKAO, T. Isoliquiritigenin, one of the antispasmodic principles of *Glycyrrhiza uralensis* roots, acts in the lower part of intestine. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 1, p. 145-49, 2007.

- SCALA, L. C.; MAGALHÃES, L. B.; MACHADO, A. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. In: MOREIRA, S. M.; PAOLA, A. V.; Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Livro Texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia**. 2ª. ed. São Paulo: Manole; p. 780-5, 2015.
- SEIDELMANN, S. B.; LIGHTHOUSE, J. K.; GREIF, D. M. Development and pathologies of the arterial wall. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 11, p. 1977-1999, 2014.
- SHAKERI, N.; ESKANDARI, F.; HAJSHAIKHOLESLAMI, F.; GHANBARIAN, A.; AZIZI, F. On the estimation of survival time and contributory risk factors in the elderly participants in the Tehran lipid and glucose study. A 10-year follow-up. **Journal of Paramedical Sciences**, v. 2, n. 2, 2011.
- SHARIFIMAJD, B.; STÂLHAND, J. A. continuum model for excitation–contraction of smooth muscle under finite deformations. **Journal of Theoretical Biology**, v. 355, p. 1–9, 2014.
- SIDDIQUI, S.; REDHU, N. S.; OJO, O. O.; LIU, B.; IRECHUKWU, N.; BILLINGTON, C.; JANSSEN, L.; MOIR, L. M. Emerging airway smooth muscle targets to treat asthma. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 132-144, 2013.
- SILVA, A. D. S.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; MATTA, C. B. B.; SILVA, D. F.; ARAÚJO, M. V.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Antinociceptive effect of 7-methoxyflavone isolated from *Zornia brasiliensis*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 18, p. 1-5, 2013.
- SILVA, J. L. V. Monitoração da atividade vasorrelaxante de extrato, fases e flavonoides obtidos de *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae). **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2005.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora. 2016.
- SOARES, L. E.; BELCAVELLO, L.; BATITUCCI, M. C. P.; AMARAL, F. T.; CUNHA, M. R. H. Avaliação dos efeitos cardiovasculares do extrato hidroalcoólico das folhas de *Zornia diphylla* (arrozinho-do-campo) em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos. In: **Anais do IV Encontro Científico de Ciências da Saúde**. Vitória-ES, 2007.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} Sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325-1358, 2003.
- SONG, Y.; KIM, M. B.; KIM, C.; KIM, J.; HWANG, J. K. Adipocytes and High-Fat Diet-Induced Obese C57BL/6J Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 19, n. 12, p. 1111-1119, 2016.
- SONGNGAM, S.; SUKWATTANASINITT, M.; SIRALERTMUKUL, K.; SAWASDEE, P. A 5,7-Dimethoxyflavone/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin inclusion complex with anti-butyrylcholinesterase activity. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 5, p. 1189-1196, 2014.

- SOUZA, R. D. **O conhecimento sobre fitoterápicos no tratamento de feridas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual de Campina Grande, Campina Grande-PB, 2013.
- SUN, Y. D.; BENISHIN, C. G. K⁺ channel openers relaxes longitudinal muscle of guinea-pig ileum. **European Journal Pharmacology**, v. 271, p. 453-459, 1994.
- TA, N.; WALLE, T. Aromatase inhibition by bioavailable methylated flavones. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 107, n. 1, p. 127-129, 2007.
- TAHARA, S. A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 6, p. 1387-1404, 2007.
- TAKAHASHI, M.; SEAGAR, M. J.; JONES, J. F.; REBER, B. F.; CATTERALL, W. A. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 15, p. 5478-5482, 1987.
- TANABE, T.; TAKESHIMA, H.; MIKAMI, A.; FLOCKERZI, V.; TAKAHASHI, H.; KANGAWA, K.; KOJIMA, M.; MATSUO, H.; HIROSE, T.; NUMA, S. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. **Nature**, v. 328, n. 6128, p. 313, 1987.
- TEP-AREENAN, P.; SAWASDEE, P.; RANDALL, M. Possible mechanisms of vasorelaxation for 5,7-dimethoxyflavone from *Kaempferia parviflora* in the rat aorta. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 10, p. 1520-1525, 2010.
- TESKE, M.; TRENTINI, A. M. **Herbarium: compendio de fitorapia**. 2 ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1995.
- TIAN, S. S.; JIANG, F. S.; ZHANG, K.; ZHU, X. X.; JIN, B.; LU, J. J.; DING, Z. S. Flavonoids from the leaves of *Carya cathayensis* Sarg. inhibit vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. **Fitoterapia**, v. 92, p. 34-40, 2014.
- TOTSUKAWA, G.; YAMAKITA, Y.; YAMASHIRO, S.; HARTSHORNE, D. J.; SASAKI, Y.; MATSUMURA, F. Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, p. 4, p. 797-806, 2000.
- TRAN, Q. K.; OHASHI, K.; WATANABE, H. Calcium signalling in endothelial cells, **Cardiovasc Research**, v. 48, p. 13–22, 2000.
- TRAN, Q. K.; OHASHI, K.; WATANABE, H. Calcium signalling in endothelial cells. **Cardiovasc Research**, v. 48, p. 13–22, 2000.
- TROVERO, F.; BROCHET, D.; BRETON, P.; TAMBUTÉ.; BÉGOS, A.; BIZOT, J. C. Pharmacological profile of CEB1957 and atropine toward brain muscarinic receptors and comparative study of their efficacy against sarin poisoning. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 150, p. 321-327, 1998.

- TRUBIANI, O.; CIANCARELLI, M.; RAPINO, M.; DI PRIMIO, R. Dimethyl sulfoxide induces programmed cell death and reversible G1 arrest in the cell cycle of human lymphoid pre-T cell line. **Immunology Letters**, v. 50, p. 51–57, 1996.
- TSCHIRHART, E.; FROSSAND, N.; BERTRAND, C.; LANDRY, Y. Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 243, p. 310-316, 1987.
- TSUJI, P. A.; WALLE, T. Inhibition of benzo [a] pyrene-activating enzymes and DNA binding in human bronchial epithelial BEAS-2B cells by methoxylated flavonoids. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 8, p. 1579-1585, 2006.
- UEHATA, M.; ISHIZAKI, T.; SATOH, H.; ONO, T.; KAWAHARA, T.; MORISHITA, T.; TAMAKAWA, H.; YAMAGAMI, K.; INUI, J.; MAEKAWA, M.; NARUMIYA, S. Calcium sensibilization of smooth muscle mediated by a rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature**, v. 389, n. 6654, p. 990-994, 1997.
- VAN ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 143, p. 299-330, 1963.
- VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 308-13, 2008.
- VERRI, A. M.; MOURA, A. A.; DE MOURA, V. M. Testes citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais provindos de plantas medicinais. **Revista Uningá Review**, v. 30, n. 1, 2018.
- VIEGAS-JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.
- WALCH, L.; GASCARD, J. P.; DULMET, E.; BRINK, C.; NOREL, X. Evidence for a M₁ muscarinic receptor on the endothelium of human pulmonary veins. **British Journal Pharmacology**, v. 130, p. 73-78, 2000.
- WALSH, C. T.; FISCHBACH, M. A. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 8, p. 2469-2493, 2010.
- WATTERSON, K. R.; RATZ, P. H.; SPIEGEL, S. The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction. **Cellular Signalling**, v. 17, p. 289 – 298, 2005.
- WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, p. 201-206, 2003.
- WEGENER, J. W.; NAWRATH, H. Cardiac effects of isoliquiritigenin. **European Journal of Pharmacology**, v. 326, n. 1, p. 37-44, 1997.
- WEN, X.; WALLE, T. Cytochrome P450 1B1, a novel chemopreventive target for benzo [a] pyrene-initiated human esophageal cancer. **Cancer letters**, v. 246, n. 1, p. 109-114, 2007.

- WEN, X.; WALLE, T. Preferential induction of CYP1B1 by benzo [a] pyrene in human oral epithelial cells: impact on DNA adduct formation and prevention by polyphenols. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 10, p. 1774-1781, 2005.
- WEN, X.; WALLE, U. K.; WALLE, T. 5,7-Dimethoxyflavone downregulates CYP1A1 expression and benzo [a] pyrene-induced DNA binding in Hep G2 cells. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 4, p. 803-809, 2005.
- WENDEL, G. H.; MARÍA, A. O. M.; GUZMÁN, J. A.; GIORDANO, O.; PELZER, L. E. Antidiarrheal activity of dehydroleucodine isolated from *Artemisia douglasiana*. **Fitoterapia**, v. 79, n. 1, p. 1-5, 2008.
- WILLIAMS, M. E.; FELDMAN, D. H.; MCCUE, A. F.; BRENNER, R.; VELICELEBI, G.; ELLIS, S. B.; HARPOLD, M. M. Structure and functional expression of α_1 , α_2 , and β subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. **Neuron**, v. 8, n. 1, p. 71-84, 1992.
- WINK, M.; MOHAMED, G. I. A. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the rbcL gene. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 8, p. 897-917, 2003.
- WOJCIECHOWSKI, M. F. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. In: KLITGAARD, B. B.; BRUNEAU, A. (Ed.). **Advances in Legume Systematic**. Kew: Royal Botanic Gardens, v. 10, p. 5-35, 2003.
- WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 177, n. 1-2, p. 135-143, 2001.
- WOODWARD, D. F.; JONES, R. L.; NARUMIYA, S. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 3, p. 471-538, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>. Acesso em 09 de Fevereiro de 2018. 2017c.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Question and answer on hypertension. Disponível em: <http://www.who.int/features/qa/82/en/>>. Acesso em 04 de março de 2018. 2015.
- WU, J. H.; LI, Q.; WU, M. Y.; GUO, D. J.; CHEN, H. L.; CHEN, S. L.; SETO, S.; AU, A. L. S.; POON, C. C.W.; LEUNG, G. P. H.; LEE, S. M.Y.; KWAN, Y.; CHAN. Formononetin, an isoflavone, relaxes rat isolated aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent pathways. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 7, p. 613-620, 2010.
- YA-JUAN, C. H. E. N.; LEI, W.; GUANG-YU, Z. H. O. U.; XIAN-LUN, Y. U.; ZHANG, Y. H.; NA, H. U.; QING-QING, L. I.; CHEN, C.; QING, C.; LIU, Y. T.; WEI-MIN, Y. A. N. G. Scutellarin attenuates endothelium-dependent vasodilation impairment induced by hypoxia reoxygenation, through regulating the PKG signaling pathway in rat coronary artery. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 4, p. 264-0273, 2015.

YANG, N.; LIANG, B.; SRIVASTAVA, K.; ZENG, J.; ZHAN, J.; BROWN, L.; SAMPSON, H.; GOLDFARB, J.; EMALA, C. LI, X. M. The *Sophora flavescens* flavonoid compound trifolirhizin inhibits acetylcholine induced airway smooth muscle contraction. **Phytochemistry**, v. 95, p. 259-267, 2013.

YUZURIHARA, M.; IKARASHI, Y.; GOTO, K.; SAKAKIBARA, I.; HAYAKAWA, T.; SASAKI, H. Geissoschizine methyl ether, an indole alkaloid extracted from *Uncariae Ramulus* et *Uncus*, is a potent vasorelaxant of isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 444, n. 3, 183-189, 2002.

ZAMPONI, G. W.; STRIESSNIG, J.; KOSCHAK, A.; DOLPHIN, A. C. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 4, p. 821-870, 2015.

ZHANG, X.; HUANG, H.; ZHAO, X.; LV, Q.; SUN, C.; LI, X.; CHEN, K. Effects of flavonoids-rich Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) pulp extracts on glucose consumption in human HepG2 cells. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 144-153, 2015.

ZIYYAT, A.; MEKHFI, H.; BNOUHAM, M.; TAHRI, A.; LEGSSYER, A.; HOERTER, J.; FISCHMEISTER, R. *Arbutus unedo* induces endothelium-dependent relaxation of the isolated rat aorta. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 572-575, 2002.

Anexo

Anexo 1 – Certidão de aprovação do projeto junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Estudo comparativo da atividade espasmolítica de flavonoides isolados de *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae)” protocolo nº 129/2016 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2017 - 2020
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> <i>Cavia porcellus</i>
Número de animais	65M 40F 96M
Idade/Peso	150-250/250-300g 300-500g
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Thomas George - UFPB

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
CEUA-UFPB